



Justus-Liebig-Universität Giessen

Institut für Neurologie



# **UNTERSUCHUNG DER MODULATION VON EXPRESSION UND FREISETZUNG DES B-ZELL- AKTIVIERENDEN FAKTORS BAFF IN MONOZYTEN**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität in Giessen

von

**Sandra Manuela Bick**

aus Dreihausen

Giessen 2011

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom März 2007 bis März 2011 am Institut für Neurologie der Justus-Liebig-Universität unter der Leitung und in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Franz Blaes durchgeführt. Die Betreuung am Fachbereich Biologie wurde von Frau Prof. Tina Trenczek übernommen. Diese Arbeit ist vom Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität genehmigt.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Volkmar Wolters

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Tina E. Trenczek
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Franz Blaes

Tag der Disputation:

„Zwei Dinge sind für unsere Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer  
und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit  
gesteckt hat, wieder zu verwerfen.“

Albert Einstein

# **I Inhaltsverzeichnis**

<b>I</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>III</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>IV</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>1.</b>	<b>BAFF – B-ZELL-AKTIVIERENDER FAKTOR DER TNF-FAMILIE.....</b>	<b>5</b>
1.1	Die TNF-Familie .....	5
1.2	Die Struktur von BAFF .....	6
1.3	Die Expression von BAFF und dessen Regulation .....	7
1.4	BAFF-Rezeptoren .....	7
1.5	BAFF in der Immunantwort .....	10
1.6	BAFF in der peripheren Toleranz und der Autoimmunität.....	11
<b>2.</b>	<b>INTRAVENÖSES IMMUNGLOBULIN (IVIg) .....</b>	<b>14</b>
2.1	Inhaltsstoffe und Herstellung von IVIg.....	14
2.2	Immunglobuline .....	15
2.3	Anwendungsgebiete .....	16
2.4	Wirkmechanismen.....	17
2.4.1	Fc-vermittelte Effekte .....	17
2.4.2	Fab-vermittelte Effekte .....	17
2.4.3	Andere immunmodulatorische Effekte .....	18
<b>3.</b>	<b>GLUCOCORTICOIDE .....</b>	<b>19</b>
3.1	Anwendungsgebiete .....	20
3.2	Wirkung und Wirkmechanismen .....	20
<b>V</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>23</b>
<b>VI</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODEN.....</b>	<b>24</b>
<b>1.</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>24</b>
1.1	Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen .....	24
1.2	Verbrauchsmaterial .....	26
1.3	Geräte .....	27
1.4	Biochemische und Molekularbiologische Kits .....	28

1.5	Zelllinien .....	28
1.6	Antikörper .....	29
1.6.1	Primärantikörper .....	29
1.6.2	Sekundärantikörper .....	29
1.7	Primer .....	30
1.8	Software .....	30
<b>2.</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>31</b>
2.1	Zellbiologische Methoden .....	31
2.1.1	Kultivierung von Zellen .....	31
2.1.2	Langzeitlagerung von Säugerzellen – Einfrieren und Auftauen .....	31
2.1.3	Mediumwechsel, Zellpassage und Zellernte .....	32
2.1.4	Primärkulturen .....	33
2.1.5	Bestimmung der Zellzahl .....	35
2.1.6	Kontrolle der Zellvitalität .....	35
2.1.7	Stimulation von immortalisierten Zellen .....	36
2.2	Immunologische Nachweismethoden .....	36
2.2.1	Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting) .....	36
2.2.2	Nachweis membrangebundener Proteine mittels Durchflusszytometrie .....	37
2.2.3	Nachweis von intrazellulären Proteinen mittels Durchflusszytometrie .....	38
2.2.4	Enzymgekoppeltes Immunadsorptionsassay (ELISA) .....	39
2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	40
2.3.1	Isolierung von Proteinen aus humanen Zellen .....	40
2.3.2	Trennung und Isolierung von Membran- und Zytoplasmaproteinen aus humanen Zellen ..	40
2.3.3	Trennung und Isolierung von Kern- und Zytoplasmaproteinen aus humanen Zellen .....	41
2.3.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	42
2.3.4.1	Kolorimetrisch .....	42
2.3.4.2	Nicht-kolorimetrisch .....	43
2.3.4.3	Nephelometrisch .....	43
2.3.5	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE) .....	44
2.3.6	Färben von SDS-Gelen .....	46
2.3.7	Western-Analyse von Proteinen (Western Blot) .....	46
2.3.7.1	Auswertung der Western-Analysen .....	48
2.4	Fraktionierung von Fab- und Fc-Fragmenten aus Immunglobulinen .....	49
2.4.1	Verdau von Immunglobulin mit Papain .....	49
2.4.2	Chromatographische Verfahren .....	50
2.4.2.1	Größenausschlusschromatographie .....	50
2.4.2.2	Affinitätschromatographie .....	51

2.4.2.2.1	Affinitätschromatographie mit Protein A-Säule .....	51
2.4.2.2.2	Affinitätschromatographie mit Protein L-Säule .....	52
2.4.2.2.3	Affinitätschromatographie mit Protein G-Säule zur Aufreinigung von Immunglobulin G aus humanem Serum .....	53
2.4.3	Aufkonzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen .....	54
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	55
2.5.1	RNA-Isolierung aus Zelllinien.....	55
2.5.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	56
2.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	56
2.5.4	Primer-Design.....	57
2.5.5	Verschiedene PCR-Techniken.....	57
2.5.5.1	Amplifikation von DNA.....	57
2.5.5.2	RT-PCR .....	58
2.5.5.3	Quantitative Realtime-PCR .....	59
2.5.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	61
2.5.7	Generierung von DNA-Standards.....	62
3.	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG .....</b>	<b>64</b>
VII	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>65</b>
1.	<b>UNTERSUCHUNG DER BASALEN EXPRESSION UND SEKRETION VON BAFF IN DEN ZELLINIEN U937, HL-60 UND THP-1 .....</b>	<b>66</b>
1.1	Membranständiges BAFF .....	66
1.2	Intrazelluläres BAFF .....	67
1.3	Sekretion von BAFF.....	68
2.	<b>WIRKUNG DES IMMUNMODULATORS GAMUNEX® AUF DIE EXPRESSION UND FREISETZUNG VON BAFF IN MONOZYTEN .....</b>	<b>69</b>
2.1	Die Effekte von IVIg.....	70
2.1.1	IVIg reguliert die Expression von membrangebundenem BAFF in Monozyten herunter ...	70
2.1.2	IVIg reguliert die Expression von intrazellulärem BAFF in Monozyten herunter .....	72
2.2	IVIg reguliert die Expression von membrangebundenem BAFF in primären Monozyten herunter .....	74
2.2.1	IVIg reguliert die Expression von intrazellulärem BAFF in primären Monozyten herunter .....	77
2.2.2	IVIg resultiert in einer Abnahme der BAFF-Freisetzung in Monozyten.....	78
2.2.3	IVIg verringert die BAFF-Freisetzung in primären Monozyten.....	79
2.2.4	IVIg führt zu einer Herunterregulierung der BAFF-mRNA in Monozyten.....	80
2.3	Reversibilität der Effekte von IVIg .....	82

2.3.1	Der Effekt von IVIg auf die membrangebundene BAFF-Expression in Monozyten ist reversibel.....	82
2.3.2	Der Effekt von IVIg auf die intrazelluläre BAFF-Expression in Monozyten ist reversibel.....	83
2.4	<i>Gamunex®</i> im Vergleich mit anderen IVIg-Präparationen .....	84
2.4.1	Herunterregulierung der membranständigen BAFF-Expression ist unabhängig von der IVIg-Präparation .....	84
2.4.2	Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression ist unabhängig von der IVIg-Präparation .....	88
2.4.3	Verringerung der BAFF-Freisetzung in Monozyten ist unabhängig von der IVIg-Präparation .....	89
2.5	IVIg im Vergleich mit IgG .....	91
2.5.1	Isoliertes humanes IgG reguliert die Expression von membranständigem BAFF in Monozyten herunter .....	91
2.5.2	Isoliertes humanes IgG reguliert die Expression von intrazellulärem BAFF in Monozyten herunter .....	92
2.5.3	Humanes IgG führt zu einer Reduktion der BAFF-Freisetzung in Monozyten.....	93
2.6	Abhängigkeit der IgG-Wirkung von der Region des Moleküls .....	94
2.6.1	F(ab') <sub>2</sub> vermittelt die herunter regulierende Wirkung von IVIg auf die Expression des membranständigen BAFF in Monozyten.....	95
2.6.2	F(ab') <sub>2</sub> vermittelt die herunter regulierende Wirkung von IVIg auf die intrazelluläre BAFF-Expression in Monozyten .....	97
2.6.3	F(ab') <sub>2</sub> vermittelt die herunter regulierende Wirkung von IVIg auf die Freisetzung des löslichen BAFF in Monozyten.....	98
2.7	Einfluss von IVIg auf die Transkriptionslevel von Fcγ-Rezeptoren in Monozyten .	99
<b>3.</b>	<b>WIRKUNG VON IMMUNSUPPRESSIVEN GLUCOCORTICOIDEN AUF DIE EXPRESSION UND FREISETZUNG VON BAFF IN MONOZYTEN .....</b>	<b>102</b>
3.1	Effekte von Dexamethason .....	102
3.1.1	Dexamethason reduziert die Expression von membrangebundenem BAFF in Monozyten .....	102
3.1.2	Dexamethason reguliert die Expression von intrazellulärem BAFF in Monozyten herunter .....	104
3.1.3	Dexamethason reduziert die Expression von membrangebundenem BAFF in primären Monozyten .....	106
3.1.4	Dexamethason reguliert die Expression von zytoplasmatischem BAFF in primären Monozyten herunter .....	107
3.1.5	Dexamethason resultiert in einer Abnahme der BAFF-Freisetzung in Monozyten.....	108

3.1.6	Dexamethason verringert die BAFF-Freisetzung in primären Monozyten .....	109
3.1.7	Dexamethason führt zu einer Herunterregulierung der BAFF-mRNA in Monozyten .....	110
3.2	Dexamethason im Vergleich mit anderen Corticoiden .....	111
3.2.1	Herunterregulierung der membranständigen BAFF-Expression in Monozyten ist unabhängig von dem Corticoid-Derivat .....	111
3.2.2	Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten ist unabhängig von dem Corticoid-Derivat .....	113
3.2.3	Herunterregulierung der Freisetzung von BAFF in Monozyten ist unabhängig von dem Corticoid-Derivat .....	115
3.3	Dexamethason und sein Antagonist RU486 .....	117
3.3.1	Herunterregulierung der membranständigen BAFF-Expression durch Dexamethason lässt sich mit RU486 blockieren .....	117
3.3.2	Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression durch Dexamethason lässt sich mit RU486 blockieren .....	120
3.3.3	Die Dexamethason-vermittelte Herunterregulierung der BAFF-Freisetzung lässt sich mit RU486 blockieren .....	121
3.4	Untersuchung der genomischen Effekte von Dexamethason .....	122
3.4.1	Promoterregion des BAFF-Gens enthält hypothetische Glucocorticoid-Rezeptor-Antwort-Bindeelement .....	122
3.4.2	Glucocorticoidrezeptor $\alpha$ -Einwanderung in den Kern von U937-Zellen ist nicht nachweisbar .....	123
<b>VIII</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>127</b>
<b>1.</b>	<b>DAS MODELL U937 – STÄRKEN &amp; SCHWÄCHEN .....</b>	<b>128</b>
<b>2.</b>	<b>MODULATION DES B-ZELL-AKTIVIERENDEN FAKTORS BAFF IN MONOZYTEN .....</b>	<b>129</b>
2.1	BAFF – Ein neues Target für IVIg? .....	129
2.2	BAFF – ein neues Target für Corticoide? .....	135
<b>3.</b>	<b>NFkB – DER GEMEINSAME NENNER? .....</b>	<b>137</b>
<b>4.</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>138</b>
4.1	BAFF .....	138
4.2	IVIg .....	140
4.3	Dexamethason .....	140
<b>IX</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>142</b>
<b>X</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>154</b>
<b>XI</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>155</b>



<b>XII ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>160</b>
<b>XIII TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>163</b>
<b>XIV DANKSAGUNG .....</b>	<b>164</b>
<b>XV EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>166</b>

## II ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Erforschung von autoimmunologischen Erkrankungen konzentrierte sich die Wissenschaft in den letzten Jahrzehnten immer mehr auf die Rolle der B-Zellen. Ihre Dysregulation kann verheerende Folgen haben, wie in Tiermodellen und Patienten gezeigt werden konnte, z. B. bei Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis, Myasthenia Gravis und Systemischer Lupus erythematoses.

Die Entdeckung des B-Zell-aktivierenden Faktors BAFF eröffnete ein neues Verständnis der B-Zell-Homöostase und neue Möglichkeiten um regulierend in die B-Zell-Immunpathologie einzugreifen, da dieses Zytokin vor allem für spätere Stadien der B-Zell-Entwicklung unabdingbar ist. Ein Zusammenhang zwischen einer Dysregulation von BAFF und der Entwicklung sowie der Progression von Autoimmunerkrankungen ist heute unumstritten. Die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

Eine Vielzahl der B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wird standardmäßig in der Praxis mit Intravenösen Immunglobulinen (IVIg) oder Corticosteroiden behandelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Modulation der BAFF-Expression in Monozyten, den Hauptproduzenten des Zytokins, durch IVIg und Corticosteroide (Dexamethason, Dex) untersucht. Mittels verschiedener Methoden (FACS, WB, Realtime-PCR) wurde in der monozytären Zelllinie U937 gezeigt, dass die BAFF-Expression auf membranständiger und zytoplasmatischer Protein- sowie auf mRNA-Ebene durch IVIg signifikant reduziert wird. Dies konnte ebenfalls für die Sekretion des löslichen BAFF bestätigt werden. In Experimenten mit primär isolierten, aktivierten Monozyten wurden diese Resultate bestätigt, was ihre physiologische Relevanz belegt. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulierung von BAFF (1) durch den Hauptbestandteil IgG und (2) vor allem durch dessen F(ab')<sub>2</sub>-Fragment vermittelt wird.

Dex führte ebenfalls auf Protein- und mRNA-Ebene zu einer Reduktion der BAFF-Expression, allerdings fiel diese im Vergleich zu IVIg schwächer aus. Der durch Dex vermittelte Effekt konnte mit Hilfe des Anti-Corticoids RU486 antagonisiert werden. Durch *in silico*-Analysen konnte eine potentielle Konsensussequenz für den Glucocorticoidrezeptor (= *glucocorticoid receptor response element* (GRE)) sowie zwei halbe GREs in der Promotersequenz des BAFF-Gens identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde BAFF als vielversprechendes Target für IVIg und Corticosteroid identifiziert und folglich Einblicke in dessen Regulation erhalten werden. Darüber hinaus kann mit der Modulation von BAFF für beide untersuchten Wirkstoffgruppen ein neuer Wirkmechanismus postuliert werden.

### III SUMMARY

Within the last few decades B cells have emerged as pivotal players in several areas of human diseases. In addition, data from animal and human studies have shown that dysregulation of this system is of disastrous consequence. Multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, myasthenia gravis and systemic lupus erythematosus are examples for human diseases with B-cell involvement.

A marked breakthrough in this field occurred with the discovery of BAFF, a B-cell activating factor of the TNF family, shedding new light on B cell homeostasis and tolerance. Its discovery opened a new avenue to the manipulation of B cells, since a dysregulation of this system is strongly associated with the development of autoimmune pathology. Nevertheless, the mechanisms of regulating BAFF expression and release have not yet been fully understood.

Many B-cell driven autoimmune diseases have been treated beneficially with intravenous immunoglobulin (IVIg) and corticosteroids for years, but both have also their disadvantages: IVIg has high treatment costs and for the future limited availability is predicted. In contrast, corticosteroids cause severe side-effects.

The present work focused on the regulation of BAFF expression and release by IVIg and dexamethasone (dex), a synthetic corticoid-derivate. Experiments were performed in monocytes, since they represent the main source of circulating BAFF in the human organism. BAFF expression and release was down-regulated in U937 cells by IVIg and to a lesser extent by dex treatment. The U937 results were confirmed using primary isolated monocytes of healthy donors, emphasizing the physiological relevance of these results. Furthermore, these findings demonstrate that the IVIg caused effect on BAFF expression and release is mediated by immunoglobulin G, especially by its F(ab')<sub>2</sub> fragment.

Moreover, dex effects could be antagonized by RU486, an anti-corticoid, inhibiting the initiation of gene transcription. In addition, *in silico* scanning of BAFF promoter sequence identified one complete putative and two half putative glucocorticoid receptor response elements (GREs). However, translocation of glucocorticoid receptor to nucleus was not detectable.

In conclusion, the down-regulation of BAFF expression and release in monocytes is a newly-described mechanism of action of IVIg and corticosteroids which might be crucial for the

beneficial treatment of mainly B-cell driven autoimmune diseases. Moreover, these findings shed new light on regulation of BAFF expression and release in monocytes.

## **IV Einleitung**

### **1. BAFF – B-Zell-aktivierender Faktor der TNF-Familie**

Vor einer Dekade wurde der B-Zell-aktivierende Faktor BAFF als neues Mitglied der Tumornekrosefaktor-(TNF)-Superfamilie erstmals beschrieben (Schneider et al. 1999). Aufgrund seiner zeitgleichen Entdeckung durch unterschiedlichen Forschergruppen ist er ebenfalls unter den Synonymen BLyS (B-Lymphozyt-Stimulator) (Moore et al. 1999), TNFSF13B (TNF-Superfamilie-Mitglied 13B), THANK (TNF-Homolog, der Apoptose, NF $\kappa$ B und cJUN-NH<sub>2</sub>-terminale Kinase aktiviert) (Mukhopadhyay et al. 1999), TALL-1 (TNF- und ApoL-verwandter auf Leukozyten exprimierter Ligand 1) (Shu et al. 1999) und zTNF4 in der Literatur zu finden. Im humanen Genom ist er auf Chromosom 13q34 kodiert.

#### **1.1 Die TNF-Familie**

Arbeiten der letzten 35 Jahre haben zu der Charakterisierung einer Proteinfamilie geführt, die nach ihrem zuerst entdeckten Mitglied, dem Tumornekrosefaktor (TNF), benannt wurde (Carswell et al. 1975; Aggarwal et al. 1984; Aggarwal et al. 1985; Kelker et al. 1985). Heute besteht diese Familie aus mehr als 20 Liganden, denen mehr als 30 Rezeptoren gegenüberstehen (Grewal 2009). Die Zytokine übernehmen eine wichtige Rolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen, bei der Immunantwort auf Infektionen und bei der Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase (Smith et al. 1994). Sie entfalten ihre Wirkung parakrin, autokrin aber auch endokrin und können dadurch Proliferation, Überleben, Differenzierung sowie Apoptose induzieren (Aggarwal 2003). Alle bisher beschriebenen Mitglieder der TNF-Familie sind Typ II Membranproteine und bestehen aus einer carboxyterminalen extrazytoplasmatischen und einer aminoterminalen intrazytoplasmatischen Domäne, die durch eine transmembrane Domäne miteinander verbunden sind. Die stets als Homotrimer auftretenden Proteine können als membrangebundene aber nach proteolytischer Prozessierung auch als lösliche Form vorliegen. Sie sind durch eine C-terminale TNF-Homologie-Domäne (THD) charakterisiert (Bodmer et al. 2002). Ihre Rezeptoren sind durch ein bis vier zysteinreichen Domänen (CRDs) in ihrer Liganden-bindenden Region gekennzeichnet (Bodmer et al. 2002). Sie werden durch das Vorhandensein oder Fehlen von zytoplasmatischen „Death domains“ (DDs) in zwei Gruppen unterteilt: DDs, die mit

Adaptorproteinen interagieren können, werden als TNF-Rezeptor assoziierte DD-Proteine (TRADDs) bezeichnet und vermitteln Apoptose. Wenn ein TNF-Rezeptor keine DDs beinhaltet, interagieren sie mit TNF-Rezeptor assoziierten Faktoren (TRAFs). TRAFs vermitteln der Zelle diverse Downstream-Effekte wie Überleben und Differenzierung (Baker und Reddy 1996; Wallach et al. 1996).

## 1.2 Die Struktur von BAFF

Das aus 285 Aminosäuren (AS) bestehende Zytokin setzt sich aus einer 46 AS großen zytoplasmatischen, einer 21 AS großen, hydrophoben transmembranen und einer 218 AS langen extrazellulären Domäne zusammen. Dieses Mitglied der TNF-Familie liegt als Homotrimer vor, bestehend aus neun  $\beta$ -Faltblättern, die in einer typische „jelly roll“-Struktur angeordnet sind. Die Monomer-Monomer-Interaktion wird durch konservierte hydrophobe Reste vermittelt und führt zur Ausbildung von drei Furchen, die mit den Rezeptoren interagieren (Gavin et al. 2003).

Bei der löslichen Form von BAFF existiert *in vitro* neben Trimeren größere Oligomere, die aus bis zu 20 Trimeren bestehen können (Zhukovsky et al. 2004; Cachero et al. 2006) und vermutlich zu einer Signalverstärkung an dem Rezeptor führt (Bossen et al. 2008).

Die THD von BAFF weist eine 20-30%ige Sequenzhomologie zu anderen Mitgliedern der Familie auf. Die höchste Sequenzhomologie besteht zu APRIL (50 %), einem proliferationsinduzierenden Liganden (Bodmer et al. 2002). Eine Besonderheit der BAFF-THD ist das Vorhandensein eines kurzen Exons, das eine typische Konsensussequenz für Furin-artige Konvertasen beinhaltet (Arg-Xxx-Arg/Lys-Arg). Außerdem enthält sie, ebenso wie die THD von APRIL, eine charakteristische Disulfidbrücke zwischen den  $\beta$ -Faltblättern D und E, wie sie auch bei „Eiger“ vorkommt, dem TNF-Homolog von *Drosophila melanogaster*. Diese Tatsache könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Moleküle von einem „Ur-TNF“-Molekül abstammen (Igaki et al. 2002).

Von BAFF gibt es neben einer vollständigen Variante zwei weitere Splicing-Varianten des Gens:  $\Delta$ BAFF und BAFF $\phi$ . Bei  $\Delta$ BAFF fehlen zwei Exons (3 und 4) und somit 57 Basenpaare (bp) im Transkript. Sequenzierungen ergaben, dass der Leserahmen trotzdem erhalten bleibt, wodurch ein funktionelles Protein entsteht. Untersuchungen dieser Splicing-Variante lassen vermuten, dass sie eine negative Regulation auf BAFF ausübt, indem Heterodimere mit dem Volllängen-BAFF gebildet werden (Gavin et al. 2003). Bei BAFF $\phi$

führt das unvollständige Splicing dagegen zu unreifen Stopp-Kodons, wodurch kein funktionelles Protein entstehen kann (Gavin et al. 2003).

### **1.3 Die Expression von BAFF und dessen Regulation**

BAFF wird hauptsächlich von Zellen monozytären Ursprungs wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Für Granulozyten wurde ebenfalls eine starke und für T-Lymphozyten (T-Zellen) eine schwache BAFF-Expression beschrieben (Nardelli et al. 2001; Litinskiy et al. 2002; Mackay et al. 2003; Scapini et al. 2003). Jüngere Arbeiten identifizierten auch nicht-lymphoide, BAFF-exprimierende Zelltypen wie Atemwegs- und Speicheldrüsenepithelzellen (Ittah et al. 2006; Kato et al. 2006), fibroblastenähnliche Synoviozyten (Ohata et al. 2005) und Astrozyten (Krumbholz et al. 2005). Gewebeuntersuchungen ergaben, dass BAFF-mRNA vor allem in lymphoiden Geweben wie Knochenmark, Lymphknoten und Milz exprimiert wird, was zu der Annahme führt, dass Zellen des lymphoiden Gewebes die Hauptproduzenten für BAFF sind. Des Weiteren wurde eine schwache Expression in Zellen von Plazenta, Herz, Lunge, Thymus und Bauchspeicheldrüse nachgewiesen (Moore et al. 1999; Schneider et al. 1999).

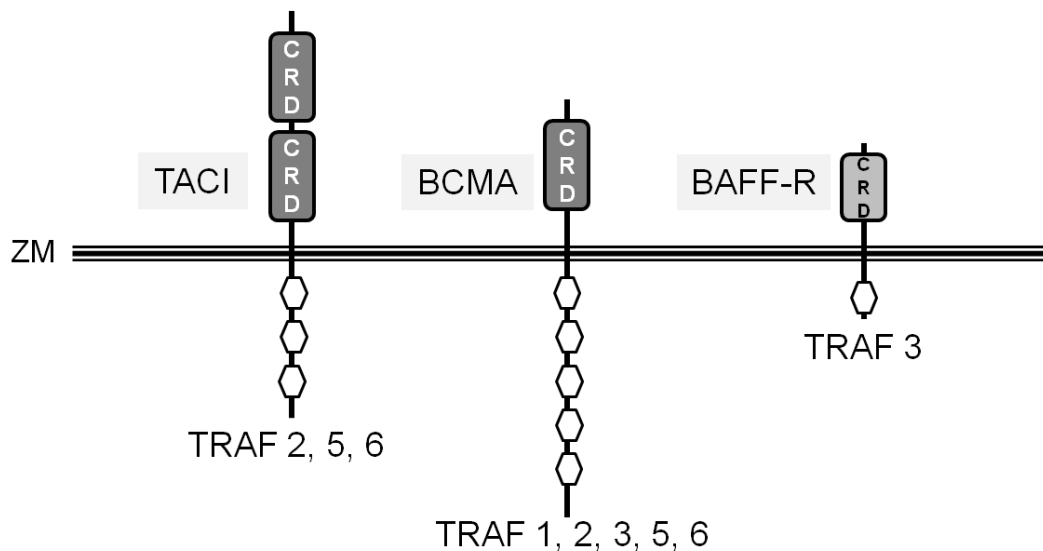
Die Produktion von BAFF wird durch ein vielschichtiges Zytokin-Netzwerk beeinflusst. In Monozyten führt die Stimulation mit IFN- $\gamma$  und IL-10 zu einem Anstieg der Expression von membranständigen BAFF, wohingegen IL-4 einen inhibitorischen Effekt vermittelt. Während durch IFN- $\gamma$  ebenfalls ein Anstieg der Expression auf mRNA-Ebene ausgelöst wird, ist dies für IL-10 nicht der Fall. Der Expressionsanstieg auf Proteinebene, der durch IL-10 verursacht wird, scheint demnach durch eine translationale oder post-translationale Regulation bedingt zu sein (Nardelli et al. 2001).

### **1.4 BAFF-Rezeptoren**

Initial wurden zwei Rezeptoren beschrieben, die neben BAFF auch APRIL binden können: BCMA (B-Zell-Maturationsantigen, TNFRSF17) und TACI (Transmembranaktivator und CAML-Interaktor, TNFRSF13B). Mittels Expressionsklonierung wurde wenig später BAFF-R (TNFRSF13C) identifiziert, welcher selektiv nur BAFF bindet (Yan et al. 2000; Thompson et al. 2001).



Bei allen drei Rezeptoren handelt es sich um Typ III-Transmembranproteine (Abb. 1). Die extrazelluläre Domäne von TACI besitzt mit zwei CRDs eine typische TNFR-Struktur (Wu et al. 2000). BCMA ist ein sehr kleiner Rezeptor, der eine CRD enthält (Marsters et al. 2000). BAFF-R beinhaltet nur eine partielle CRD mit einer sehr atypischen Anordnung der konservierten Zysteinreste (Thompson et al. 2001). BAFF-R und TACI sind typische membranständige Rezeptorproteine, wohingegen BCMA überwiegend im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Gras et al., 1995). Während bei den meisten Mitgliedern der TNFR-Familie zwei CRDs in die Vertiefungen zwischen den Untereinheiten der Liganden binden, wurde für BAFF-R gezeigt, dass die Interaktion mit BAFF von ein paar wenigen AS eines 26 AS großen Kernbereichs vermittelt wird (Kayagaki et al. 2002).

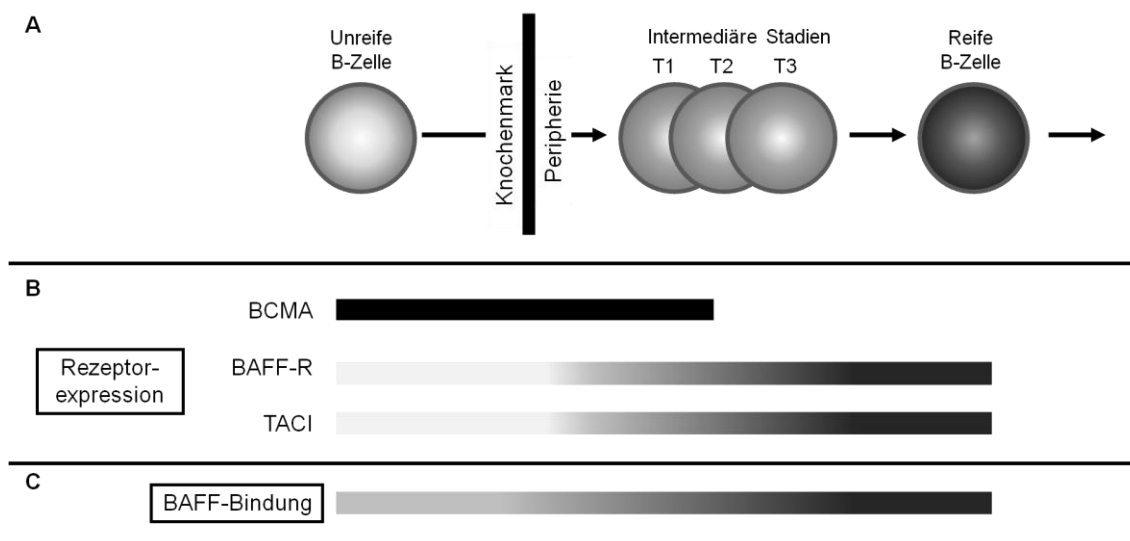


**Abb. 1: Struktureller Aufbau der BAFF-Rezeptoren.**

Drei Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie binden BAFF: TACI, BCMA und BAFF-R. Alle drei besitzen die für diese Familie typischen Zystein-reichen Domänen (CRDs) im extrazellulären Abschnitt. Durch die Interaktion mit diversen TNF-assoziierten Faktoren (TRAFs) werden die entsprechenden Signale an die Zelle vermittelt. ZM: Zyttoplasmamembran (modifiziert nach Mackay und Browning 2002; Mackay und Schneider 2009)

Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass BAFF-R essentiell für die Vermittlung der Überlebenssignale von BAFF auf B-Lymphozyten (B-Zellen) ist (Mackay et al. 2003). Alle drei Rezeptoren werden vornehmlich von B-Zellen exprimiert, allerdings nicht gleichzeitig sondern in unterschiedlicher Intensität zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten, wodurch BAFF nicht für alle B-Zellstadien essentiell ist (Hsu et al. 2002; Mackay et al. 2003; Cancro 2004). So wird BCMA hauptsächlich in den frühen Stadien

der B-Zellentwicklung exprimiert, TACI und BAFF-R werden erst ab dem zweiten intermediären Stadium verstärkt in B-Zellen gebildet (Abb. 2).



**Abb. 2: Expression der BAFF-Rezeptoren und die BAFF-Abhängigkeit von B-Zellen in den Stadien der B-Zellentwicklung.**

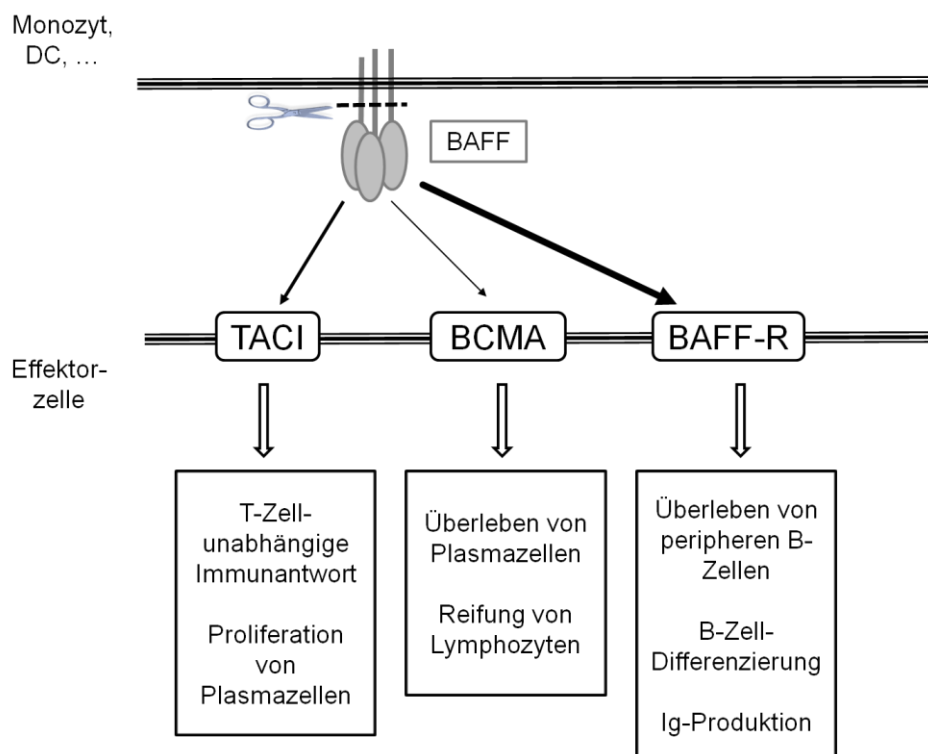
(A) Die Stadien der B-Zellentwicklung. (B) Expression der Rezeptoren während der B-Zellentwicklung: BCMA wird hauptsächlich in den frühen, TACI und BAFF-R in den späteren Stadien exprimiert. (C) Die Fähigkeit der B-Zellen BAFF zu binden ist am Anfang relativ schwach, nimmt aber mit dem Fortschreiten ihrer Entwicklung zu (modifiziert nach Cancro 2004).

Die Analyse der Expression von BAFF-Rezeptoren auf anderen Zellen zeigte, dass beispielsweise BAFF-R in T-Zellen nach einer Aktivierung hoch reguliert wird. Des weiteren wurde die intrazelluläre Expression von TACI in Monozyten und Dendritischen Zellen und die extrazelluläre Expression als Folge einer Stimulierung beschrieben (Chang et al. 2006; Chang et al. 2008).

Die Affinität der drei Rezeptoren BAFF zu binden ist unterschiedlich und nimmt in folgender Reihenfolge zu: BCMA - TACI – BAFF-R (Abb. 3) (Bossen und Schneider 2006).

Vor kurzem wurde ein weiterer Rezeptor beschrieben, der BAFF binden kann, aber nicht zur TNF-Familie gehört. Es handelt sich dabei um den Nogo-66-Rezeptor, der von Neuronen exprimiert wird (Zhang et al. 2009). Dieser Rezeptor bindet ausschließlich Inhibitoren des axonalen Wachstums im Zentralen Nervensystem (ZNS) wie Nogo, wodurch das Wachstum von Axonen des ZNS überwacht wird (McKerracher und David 2004). In diesem

Zusammenhang wurde BAFF als negativer Regulator neuronaler Funktionen beschrieben, der das Wachstum von Zellen dorsaler Spinalganglien *in vitro* inhibiert (Zhang et al. 2009).



**Abb. 3: Interaktion von BAFF mit seinen Rezeptoren und ihre Funktion im Immunsystem.**

BAFF bindet mit unterschiedlich hoher Affinität (dargestellt durch die Pfeilstärke) an die Rezeptoren TACI, BCMA und BAFF-R, die ihrerseits unterschiedliche Signale an die Zielzelle vermitteln (modifiziert nach Schneider 2005).

## 1.5 BAFF in der Immunantwort

B-Zellen stellen das Zentrum der humoralen Immunantwort dar. Sie entstehen aus Stammzellen im Knochenmark, von wo aus sie als unreife B-Zellen in die Peripherie gelangen. Zur vollständigen Ausreifung wandern sie in periphere Lymphorgane wie die Milz ein, anschließend zirkulieren sie als reife B-Zellen in der Peripherie und produzieren Antikörper.

Bereits frühe Ergebnisse der BAFF-Forschung legten die Vermutung nahe, dass dieses Mitglied der TNF-Familie eine essenzielle Rolle für das Überleben und die Reifung von B-Zellen spielt (Mackay et al. 1999; Rolink und Melchers 2002; Rolink et al. 2002). So führte die Injektion von exogenem BAFF in Mäusen zu einer schnellen, reversiblen Verdopplung der B-Zellzahlen und zu einer Erhöhung des Immunglobulinspiegels (Moore et al. 1999; Khare et al. 2000), wohingegen die Injektion von löslichen BAFF-Rezeptoren wie BCMA-Ig

und TACI-Ig in einer immensen Verringerung der Zellzahl fast aller peripherer B-Zelltypen resultierte (Yan et al. 2000; Yu et al. 2000). Für die Funktion von BAFF als B-Zell-Überlebensfaktor wird in der Hauptsache die Interaktion mit BAFF-R verantwortlich gemacht (Mackay et al. 2003). In Experimenten mit BAFF<sup>-/-</sup> und BAFF-R<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte gezeigt werden, dass B-Zellen vor allem in dem intermediären Stadium 2 (T2) und bei der Aufrechterhaltung der Germinalen Zentren von BAFF abhängig sind (Rahman et al. 2003; Mackay und Schneider 2009). Der Phänotyp dieser Mäuse zeigte eine normale B-Zellentwicklung bis zum T1-Stadium, allerdings immense Defizite ab dem T2-Stadium und in der Reifung der marginalen Zone. Die durch die BAFF/BAFF-R-Interaktion vermittelten Überlebenssignale sind das Resultat einer Aktivierung von anti-apoptotischen Signale und einer Herabsetzung pro-apoptotischer Signale (Batten et al. 2000; Do und Chen-Kiang 2002; Amanna et al. 2003; Craxton et al. 2005). Mittels der Interaktion mit seinen Rezeptoren werden durch BAFF unterschiedliche Signale zu unterschiedlichen Zeitpunkten an die B-Zellen vermittelt. BCMA wird hauptsächlich für die Übermittlung von Reifungssignalen verantwortlich gemacht, die primär für unreife B-Zellen und die frühen intermediären Stadien wichtig sind. TACI, der wie BAFF-R erst ab dem intermediären Stadium 2 und von reifen B-Zellen stark exprimiert wird, übermittelt Signale für die B-Zell-Proliferation und das Überleben der Plasma-Zellen, wie in Abb. 3 dargestellt ist (Hsu et al. 2002; Schneider 2005; Tangye et al. 2006).

Obwohl auch T-Zellen BAFF-R exprimieren (Ng et al. 2004) sind die T-Zellzahlen in BAFF-defizienten Mäusen normal (Moisini und Davidson 2009), so dass eine costimulatorische Rolle bei T-Zellen nach wie vor umstritten ist.

## **1.6 BAFF in der peripheren Toleranz und der Autoimmunität**

Die Immuntoleranz stellt sicher, dass das Immunsystem in der Lage ist „fremd“ von „eigen“ zu unterscheiden. Sie wird an kritischen Punkten der B-Zellentwicklung sowohl zentral als auch peripher kontrolliert. Die zentrale, erste Selektion findet im Knochenmark statt. Die B-Zellen werden anhand eines funktionellen B-Zellrezeptors (BCR) auf ihrer Oberfläche selektiert (positive Selektion) (Lam et al. 1997; Neuberger 1997). Aufgrund der bislang vorliegenden Erkenntnisse ist eine Beteiligung von BAFF bei der zentralen Selektion auszuschließen (Gross et al. 2001; Schiemann et al. 2001).

Die zweite Selektion ereignet sich in der Peripherie und folgt dem Prinzip einer negativen Selektion. Dabei werden die Zellen, die körpereigene Antigene erkennen durch B-Zellrezeptor-vermittelte Apoptose eliminiert. Zwischen dem Austritt aus dem Knochenmark und dem Eintritt in die Milz werden ca. 80 % der kurzlebigen, unreifen B-Zellen ausgesondert (Rolink et al. 1999). Ein Verlust der Selbsttoleranz führt zur Produktion von pathologischen Auto-Antikörpern, welche eine akute inflammatorische Kaskade auslösen, bei der körpereigene Zellen und Gewebe angegriffen werden. In der Folge kommt es zur Manifestation einer Autoimmunerkrankung.

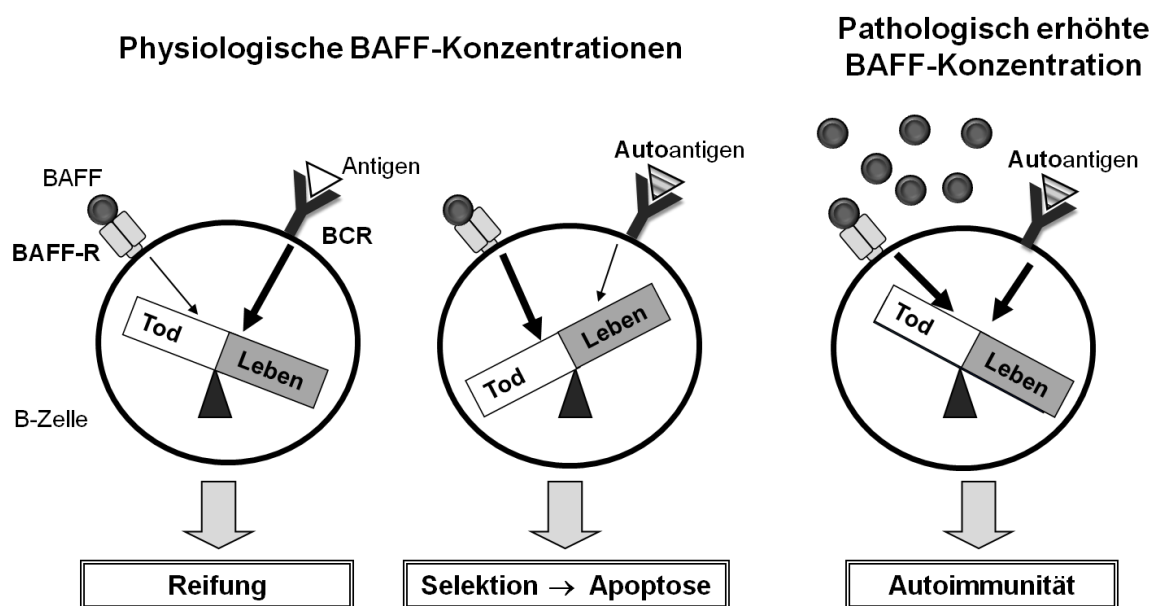
Studien in Tiermodellen und Messungen der BAFF-Level im Serum von Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen legen die Vermutung nahe, dass es eine Verbindung zwischen BAFF und Autoimmunität gibt (Baker 2004). Die bisher etablierten BAFF-transgenen Mausmodelle zeigen als gemeinsamen Phänotyp eine B-Zell-Hyperplasie ab dem T2 B-Zellstadium. Wenn die Tiere älter werden entwickeln sie eine T-Zell-unabhängige Autoimmunität mit Glomerulonephritis, Entzündungen und Zerstörung der Speicheldrüsen und der Produktion von Autoantikörpern. (Mackay et al. 2005; Mackay und Leung 2006; Groom et al. 2007). Viele dieser Symptome entsprechen dem Krankheitsbild des humanen Sjögrens Syndrom (SS) (Groom et al. 2002). In BAFF-Knockout-Mäusen dagegen wird das Krankheitsbild von deutlich verringerten Immunglobulinlevel und einer starken Beeinträchtigung der B-Zell-Reifung ab dem T1-Stadium bestimmt (Mackay et al. 2003).

In den letzten Jahren wurden immer mehr humane Autoimmunerkrankungen mit einer Dysregulation des BAFF-Systems in Zusammenhang gebracht: Erhöhte systemische BAFF-Level im Serum wurden u. a. für Patienten mit einer Systemischen Lupus erythematoses (SLE) (Cheema et al. 2001; Zhang et al. 2001), Sjögrens Syndrom (SS) (Groom et al. 2002), Rheumatoider Arthritis (RA) (Cheema et al. 2001), Multipler Sklerose (MS) (Krumbholz et al. 2005) und Asthma (Kang et al. 2006) beschrieben. Ein lokaler Anstieg von BAFF-Level wurde ebenfalls berichtet wie in zerebralen MS-Läsionen (Krumbholz et al. 2005), in der Gelenkflüssigkeit bei Patienten mit RA (Cheema et al. 2001), in den Speicheldrüsen von Patienten mit SS (Groom et al. 2002) und im Liquor von Patienten mit dem Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS) (Fuhlhuber et al. 2009).

Mittlerweile liegt ein Modell vor, mit dem die Rolle von BAFF in der Regulation der B-Zell-Toleranz sehr plausibel erklärt werden kann: Unter physiologischen BAFF-Konzentrationen findet eine reguläre Selektion der B-Zellen in der Peripherie statt. Der B-Zell-Rezeptor übernimmt die spezifischen Selektion, während BAFF-vermittelte Signale vermutlich die Größe des peripheren B-Zellpools determinieren (Thomas et al. 2006). Bindet eine B-Zelle

ein Autoantigen, werden der Zelle pro-apoptotische Signale vermittelt, die durch die anti-apoptischen Effekte physiologischer BAFF-Konzentrationen nicht ausgeglichen werden können. Die Zelle wird durch Apoptose eliminiert. Unter diesen Gegebenheiten steht das Gleichgewicht zwischen selbst- und nicht-selbstreaktiven Zellen zu Gunsten der nicht-selbstreaktiven B-Zellen.

Ein Anstieg der BAFF-Konzentration führt allerdings zu einer Störung dieser empfindlichen Balance: Autoreaktive B-Zellen werden vermehrt vor ihrer Eliminierung bewahrt, da durch BAFF nun anti-apoptotische Signale verstärkt und pro-apoptotische Signale verringert werden (Abb. 4) (Mackay und Browning 2002). Diese autoreaktiven B-Zellen gelangen in die Peripherie, wo sie sich zu Autoantikörper- und IL-10-produzierenden B-Zellen entwickeln (Xu und Shu 2002). In diesem System stellt BAFF somit eine limitierende Ressource dar, die die Menge an überlebenden autoreaktiven Zellen bedingt (Lesley et al. 2004; Thien et al. 2004).



**Abb. 4: Die Rolle von BAFF in der peripheren Toleranz und bei der Entstehung von Autoimmunität.**

Unter physiologischen BAFF-Konzentrationen führt die Bindung eines „Fremd“-Antigens an den B-Zell-Rezeptor dazu, dass der Zelle antiapoptotische Signale vermittelt werden; sie kann sich zu einer reifen B-Zelle entwickeln. Bindet sie während der Selektion ein Autoantigen, dann werden pro-apoptotische Signale vermittelt und sie wird eliminiert. Das BAFF-vermittelte Überlebenssignal ist dann nicht stark genug um das pro-apoptotische Signal auszugleichen. Ist die BAFF-Konzentration allerdings pathologisch erhöht, kann die Zelle trotz Bindung eines Autoantigens dem Zelltod entkommen und in die Peripherie gelangen (modifiziert nach Mackay und Browning 2002).

Die oben beschriebenen Phänomene lassen eine Verbindung zwischen BAFF und Autoimmunität vermuten, so dass ein tatsächlicher Zusammenhang zwischen diesem Zytokin und der Krankheitsursache sowie der –progression anzunehmen ist. In der weiteren Konsequenz stellt BAFF damit ein vielversprechendes Ziel für neue therapeutische Ansätze in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen dar. Zurzeit sind mehrere potentielle Therapien, die in das BAFF-System eingreifen, in der Erprobung, z. B. Anti-BAFF (*LymphostatB*; *belimumab*) und IgG-Fusionsproteine gegen die drei Rezeptoren (BAFF-R, BCMA, TACI). *Belimumab* ist ein vollständig humanisierter monoklonaler Antikörper gegen die lösliche Form von BAFF, der entwickelt wurde, um das Zytokin zu neutralisieren (Baker et al. 2003). Das Anti-BAFF-Rezeptor-Fusionsprotein bindet an lösliches BAFF-R-, wodurch die BAFF-vermittelten Signale ebenfalls inhibiert werden. Das rekombinante BCMA-IgG-Fusionsprotein bindet mit hoher Affinität APRIL, wodurch dieser Faktor neutralisiert wird. BAFF ist weniger stark davon betroffen (Sutherland et al. 2006). Das TACI-IgG-Fusionsprotein (*Atacicept*) neutralisiert BAFF und APRIL (Sutherland et al. 2006). Diese Medikamente sollen bei der Behandlung von SS, SLE, der MS und anderen Autoimmunerkrankungen zum Einsatz kommen.

## 2. Intravenöses Immunglobulin (IVIg)

### 2.1 Inhaltsstoffe und Herstellung von IVIg

IVIg ist eine Immunglobulinpräparation. Die Immunglobuline (Igs) werden aus humanem Serum von mehr als 1000 gesunden Spendern mittels Ethanol-Fraktionierung bei niedrigem pH-Wert gewonnen (= Cohn-Fraktionierung) (Kazatchkine und Kaveri 2001; Lemm 2002). In der Hauptsache enthält es Immunglobulin G (IgG; > 98 %), aber auch Spuren von Immunglobulin A und Immunglobulin M. Die IgG-Subklassenverteilung entspricht der im Normalserum (IgG<sub>1</sub>: ca. 66 %, IgG<sub>2</sub>: ca. 27 %; IgG<sub>3</sub>: ca. 4,3 %; IgG<sub>4</sub>: ca. 2,2 %). Da die Cohn-Fraktionierung nur eine nahezu vollständige Separierung von Immunglobulinen und anderen Proteinen zulässt, können in den IVIg-Präparationen Spuren von weiteren, potentiell immunregulatorischen Inhaltsstoffen wie Zytokine nachgewiesen werden (Blasczyk et al. 1993; Lam et al. 1993). Die Halbwertszeit von infundiertem IVIg beträgt ca. 3 Wochen. Es ist ein relativ sicheres Medikament ohne Langzeit-Nebenwirkungen. Auch wenn die Gabe von IVIg in einzelnen Fällen zu generellen Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Fieber und

Übelkeit führt, fallen diese Reaktionen in der Regel eher mild aus und lassen sich gut durch entzündungshemmende Medikamente oder eine Herabsetzung der Infusionsrate lindern. Aufgrund der besseren Verträglichkeit wird die Therapie mit IVIg oft anderen Standardbehandlungsmethoden wie der Plasmapherese oder der Behandlung mit Steroiden vorgezogen. Der Nachteil bei der Behandlung mit hochdosierten Antikörpern liegt allerdings bei den hohen Kosten der Therapie (Bierling und Godeau 2005).

## 2.2 Immunglobuline

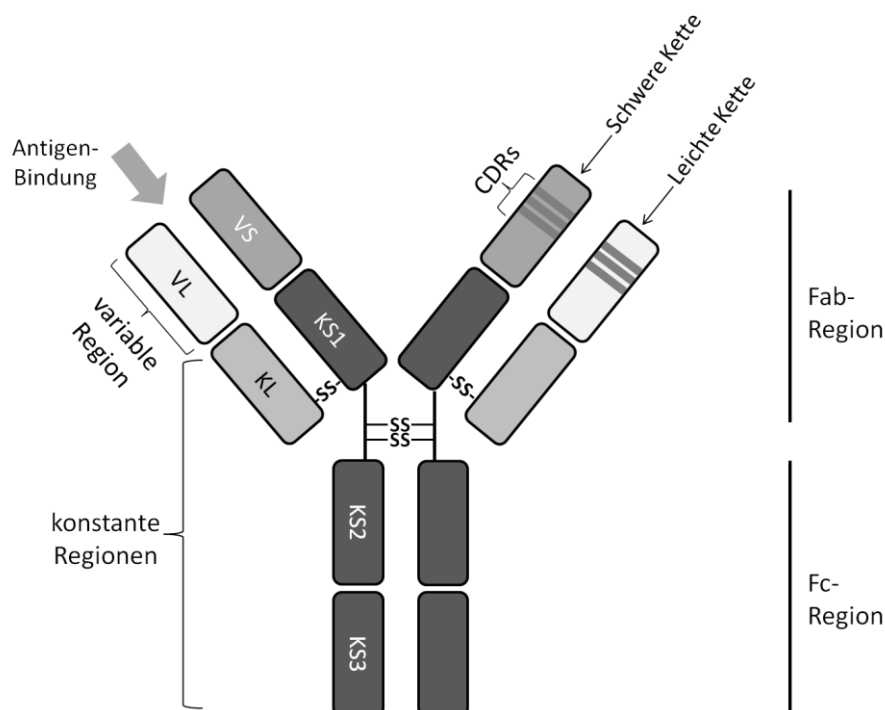
Immunglobuline werden von aktivierten B-Zellen gebildet und stellen ein zentrales Werkzeug der humoralen Immunantwort dar. Es sind Glykoproteine die im Blutplasma durch den Organismus zirkulieren. Sie bestehen aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Edelman 1991). Anhand der schweren Ketten,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ , werden fünf Isotypen unterschieden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Jeder Isotyp besitzt spezielle funktionelle Eigenschaften, die durch den Typ der schweren Kette determiniert sind (Cohen und Milstein 1967; Franklin 1975). Im Folgenden soll hier nur auf IgG eingegangen werden, da es den häufigsten Isotyp im Blutplasma darstellt.

IgG besitzt die für Antikörper typische Y-förmige Struktur. Der untere Teil dieses Ypsilon wird durch ein Fc-Fragment (= kristallines Fragment) gebildet, der obere Teil durch zwei Fab-Fragmente (= Antigen-bindend). Durch proteolytische Spaltung der Disulfidbrücken können die Fragmente voneinander getrennt werden. Je nach verwendetem Enzym entstehen dabei ein F(ab')<sub>2</sub>-Fragment und mehrere kleinere Fc-Fragmente (Spaltung mit Pepsin) oder zwei Fab-Fragmente und ein vollständiges Fc-Fragment (Spaltung mit Papain). Das Fc-Fragment stellt die konstante Region eines Antikörpers dar und bestimmt die funktionellen Eigenschaften. Es besteht ausschließlich aus schweren Ketten. IgG kann durch dieses Fragment mit Fc-Rezeptoren auf Immuneffektorzellen wie Makrophagen, Monozyten und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie mit Faktoren des Komplementsystems interagieren (Han et al. 1995; Jefferis et al. 1995; Sensel et al. 1997).

Das Fab-Fragment setzt sich aus einer vollständigen leichten und einer halben schweren Kette zusammen (Porter 1991; Yamaguchi et al. 1995). Es kann in eine konstante und eine variable Region unterteilt werden. Letztere wird aus den aminoterminalen Teilen der leichten Ketten und der schweren Kette gebildet und enthält die hypervariablen Bereiche, die auch als CDR-



Regionen (engl. *complementary determining regions*) bezeichnet werden, da sie das zu bindende Antigen festlegen, wie in Abb. 5 dargestellt ist (Poljak 1991).



**Abb. 5: Schematisch Darstellung eines IgG-Antikörpers**

KS: konstante schwere Region; VS: variable schwere Region; VL: variable leichte Region; KL: konstante leichte Region; CDRs: hypervariable Regionen; -SS-: Disulfidbrücke

## 2.3 Anwendungsgebiete

Ursprünglich wurde IVIg als Substitution für Immunglobuline zur Behandlung von Patienten mit primären und sekundären Immunschwächen eingesetzt. Seit der Erstbeschreibung seiner antiinflammatorischen Wirkung bei der idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (ITP) (Imbach et al. 1981) hat sich sein Indikationsspektrum rapide erweitert. Heutzutage wird es bei der Behandlung von diversen Autoimmun- und systemischen Entzündungserkrankungen wie die Kawasaki-Krankheit und Dermatomyositis eingesetzt (Kazatchkine und Kaveri 2001; Rosen und Mackay 2001). Darüber hinaus findet es erfolgreiche Anwendung bei der Behandlung von neuroimmunologischen Antikörper- oder B-Zell-vermittelten Erkrankungen wie der chronisch-entzündlichen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP), dem Guillain-Barré Syndrom (GBS) und der Myasthenia Gravis (MG) (Dalakas 2002; Hughes et al. 2003; Hughes et al. 2008; Eftimov et al. 2009).

## 2.4 Wirkmechanismen

Die Wirkungsweise von IVIg ist viel diskutiert und bisher nicht eindeutig geklärt. Im Wesentlichen wird in der Literatur zwischen den Fc- und den Fab-vermittelten immunmodulatorischen Wirkungen unterschieden.

### 2.4.1 Fc-vermittelte Effekte

Fc-Moleküle können mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) auf der Oberfläche von Immuneffektorzellen interagieren. Vier Klassen von Fc $\gamma$ R sind bisher bekannt: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII und Fc $\gamma$ RIV (Nimmerjahn und Ravetch 2006). Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIIA und Fc $\gamma$ RIV werden als aktivierende Rezeptoren beschrieben, Fc $\gamma$ RIIB dagegen als inhibierender Rezeptor. Die aktivierenden Fc $\gamma$ R gelten als Hauptvermittler der proinflammatorischen Aktivität bei Autoimmunerkrankungen (Binstadt et al. 2003). Bei IVIg-Gabe kann der Fc-Teil von IVIg mit den Fc $\gamma$ Rs von phagozytischen Zellen interagieren, wodurch die Rezeptoren blockiert werden. Diese Blockade wird vermutlich durch die Sättigung, aber auch durch eine Herunterregulierung der Rezeptoraffinität erreicht und verhindert z. B. in GBS und CIDP die Makrophagen-vermittelte Demyelinisierung (Dalakas 1997; Dalakas 1998). Des weiteren wurde mehrfach die Modulation von Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf Immuneffektorzellen durch IVIg beschrieben, u. a. die Hochregulierung des inhibitorischen Fc $\gamma$ RIIB z. B. in Maus-Makrophagen sowie in humanen B-Zellen und Monozyten (Samuelsson et al. 2001; Tackenberg et al. 2009). Ein Zusammenspiel der Herunterregulierung von aktivierenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren und einer Hochregulierung des inhibitorischen Fc $\gamma$ -Rezeptors wäre ebenfalls denkbar (Kaneko et al. 2006). Eine kritische Rolle für die antientzündliche Wirkung von Fc-Fragmenten übernimmt möglicherweise die Zusammensetzung des Zuckerderivats an Position N297 des Fc-Fragments (Parekh et al. 1985; Malhotra et al. 1995; Arnold et al. 2007; Nimmerjahn et al. 2007).

### 2.4.2 Fab-vermittelte Effekte

IVIg enthält aufgrund seiner Herstellungsweise ein breites Spektrum an anti-idiotypischen Antikörpern, die als Dimere vorliegen. Anti-idiotypische Antikörper sind Antikörper, die gegen die Bindungsstellen eines anderen Antikörpers oder deren benachbarter Region gerichtet sind. Ein für Fab-Fragmente postulierter Wirkmechanismus beschreibt die Bindung

von anti-idiotypischen Antikörpern an pathologische Auto-Antikörper, z. B. anti-DNA und anti-AChR (Zweiman 1989; Krause et al. 1998). Diese Neutralisierung führt dazu, dass die Autoantikörper nicht mehr mit ihren Autoantigenen interagieren können (Dwyer 1992; Dalakas 1997; Dalakas 1998; Dalakas 1999; Kazatchkine und Kaveri 2001). Ein weiterer Fab-vermittelter Effekt ist die Modulation der Produktion von Autoantikörpern in B-Zellen. Bei ITP-Patienten, die mit IVIg behandelt wurden, war zu beobachten, dass Langzeiteffekte mit einer erniedrigten Autoantikörper-Produktion einhergingen (Dammacco et al. 1986). Im Maus-Modell konnte ungefähr zehn Jahre später gezeigt werden, dass spezifische autoreaktive B-Zellen durch IVIg herunter reguliert werden (Vassilev et al. 1999). Es wird vermutet, dass die Bindung von anti-idiotypischen Antikörpern an B-Zell-Rezeptoren hemmende Signale an die autoreaktiven Zellen vermittelt (Uher und Dickler 1986; Diegel et al. 1994; Gold et al. 2007).

### **2.4.3 Andere immunmodulatorische Effekte**

Außer den oben bereits aufgeführten Effekten gibt es weitere Mechanismen, die sich nicht direkt durch Fab- oder Fc-Fragmente erklären lassen, wie die Inhibierung des Komplementsystems (Basta et al. 1989; Dalakas 2002) und die Hemmung der Proliferation primärer Immunzellen (van Schaik et al. 1992; Amran et al. 1994; Xu et al. 1998).

Im Rahmen von Untersuchungen der IVIg-Wirkung auf T-Zellen wurde beschrieben, dass IVIg die Anzahl der T-Helferzellen reduziert (Tsubakio et al. 1983) und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf ihrer Oberfläche modifizieren kann (Koffman und Dalakas 1997). Langzeiteffekte von IVIg waren außerdem mit einer gesteigerten T-Suppressor-Funktion verbunden (Delfraissy et al. 1985). Neuere Ergebnisse beschreiben, dass IVIg zu einer Expansion von regulatorischen T-Zellen (Tregs) führt und ihre suppressiven Eigenschaften verstärkt (Sakaguchi et al. 2008; Tha-In et al. 2008). Dendritische Zellen werden durch IVIg in ihrer Funktion, ihrer Reifung und ihrer Differenzierung inhibiert (Bayry et al. 2003).

Untersuchungen zum Einfluss von IVIg auf die Zytokin-Regulation haben gezeigt, dass die Präparation in der Lage ist in die Produktion von Zytokinen und Zytokin-Rezeptoren einzugreifen. Auch Zytokin-Antagonisten werden beeinflusst (Abe et al. 1994; Ruiz de Souza et al. 1995; Andersson et al. 1996; Aukrust et al. 1999). Wird die Expression von Entzündungsmediatoren durch Zytokine induziert, so ist IVIg in der Lage, die Expression herunter zu regulieren (Xu et al. 1998). Es wird vermutet, dass die Modulation der Zytokine eine der Hauptursachen für die Wirksamkeit von IVIg ist.

### 3. Glucocorticoide

Glucocorticoide (GCs) gehören wie die Mineralcorticoide (MCs) und Androgene zu den Steroidhormonen und werden in der Nebennierenrinde gebildet. GCs und MCs werden auch als Corticosteroide zusammengefasst. Ausgangsprodukt für die Synthese der GCs ist das Cholesterin, welches in den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum durch eine Reihe enzymatischer Modifikationen zu Cortison und Cortisol prozessiert wird. Die Biosynthese der GCs steht unter regulatorischer Kontrolle der Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrinden-Achse (HPA). Dabei regt das im Hypothalamus gebildete Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) über das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) die Synthese der GC-Hormone in der inneren Zone der Nebennierenrinde an (Chrousos 1995). Bei erhöhtem Corticoidspiegel im Blut wird die CRH- und ACTH-Ausschüttung mittels einer negativen Rückkopplung gestoppt (Baxter und Rousseau 1979; Chrousos 1995).

Seit der Entdeckung ihrer antirheumatischen Wirkung in den vierziger Jahren zählen GCs zu den wirksamsten Medikamenten zur Behandlung von allergisch-entzündlichen und autoimmunologischen Erkrankungen. Wegen ihrer vielseitigen Effekte auf die verschiedensten Körperkreisläufe kommt es im Rahmen der Langzeittherapie allerdings auch zu einer Reihe unerwünschter Nebenwirkungen. Zu diesen zählen u. a. das Cushing-Syndrom, Diabetes mellitus und Osteoporose (Lukert und Raisz 1990; Biering et al. 2000; Clauss 2009). Die unerwünschten Nebenwirkungen werden vor allem durch mineralcorticoide Effekte ausgelöst. Aus diesem Grund ist die pharmazeutische Industrie seit längerem darum bemüht, synthetische GC-Derivate mit potenziert antientzündlicher und immunsuppressiver Wirkung bei gleichzeitiger Reduktion der mineralcorticoiden Wirkung herzustellen. So weist z. B. Dexamethason, ein fluoriertes GC-Derivat, eine 40-fach stärkere Wirkung als das natürliche Cortison auf. Versuche zur Vermeidung unerwünschter Nebenwirkungen durch alleinige Strukturveränderung des Moleküls sind allerdings bis heute relativ erfolglos geblieben (Schacke et al. 2002). Allerdings brachte die Entwicklung von lokal verabreichbaren Derivaten eine teilweise Verringerung der unerwünschten Nebeneffekte mit sich. Eine lokale Therapie wird heute durch Präparate zur Inhalation für Asthma und zur intraartikulären Injektion für Rheumatoide Arthritis ermöglicht (Stahn et al. 2007).

### **3.1 Anwendungsgebiete**

GCs werden als Substitutionstherapie bei primärer und bei sekundärer Nebenniereninsuffizienz verabreicht. Von weitaus größerer Bedeutung sind sie allerdings wegen ihrer antirheumatischen, antiallergischen, immunsuppressiven und antientzündlichen Wirkung. Aufgrund dieses vielfältigen Wirkungsspektrums werden sie zur Behandlung von entzündlichen und autoimmunologischen Erkrankungen wie RA, Asthma, MS, Kawasaki-Krankheit und SLE (Dale et al. 2000; Buttgereit et al. 2004; Clauss 2009; Du et al. 2009; Luhder und Reichardt 2009; Rottier und Duiverman 2009) eingesetzt.

### **3.2 Wirkung und Wirkmechanismen**

GCs sind pleiotrop wirkende Hormone, die regulatorisch an zahlreichen Prozessen des Körpers beteiligt sind (Baxter und Rousseau 1979; Schacke et al. 2002). Ihre Effekte auf den Stoffwechsel dienen der Energiebereitstellung. Neben dem Erhalt der Glukose-Homöostase sind sie ebenfalls an der Regulation des Bindegewebe-, Kalzium- und Knochenstoffwechsel beteiligt (Reichardt und Schutz 1998; Grose et al. 2002; Clauss 2009). Darüber hinaus sind sie auch von entwicklungsbiologischer Relevanz, weil sie unter anderem bei der Reifung von Lunge, Magen-Darm-Trakt und Leber eine essentielle Rolle spielen (Baxter und Rousseau 1979; Cole et al. 1995).

Die Wirkung der GCs auf das Immunsystem ist vielfältig und komplex. In vielen Immuneffektorzellen führen sie zu einer Hemmung der Proliferation, z. B. in Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten, und zu einer Hemmung der Zytokinfreisetzung, vor allem pro-inflammatorische Zytokine wie IL-2, IL-6 und TNF- $\alpha$  (Kassel und Cato 2002; Belvisi 2004; Valledor und Ricote 2004; Stahn et al. 2007). Darüber hinaus können sie in Lymphozyten Apoptose induzieren (Guizani et al. 1996; Lanza et al. 1996; Distelhorst 2002). Aufgrund ihrer vielseitigen, primär hemmenden Wirkungen auf das Immunsystem stellen GCs ein wichtiges Kontrollinstrument der Homöostase dar, indem sie entgleiste Entzündungsprozesse oder allergische Ereignisse unterdrücken und damit verbundene gewebsschädigende Folgen für den Organismus verhindern.

Die Vermittlung der immunsuppressiven und antientzündlichen Wirkung von GCs erfolgt vor allem durch genomische Mechanismen. Vermutlich wird ungefähr ein Fünftel der in humanen Leukozyten exprimierten Gene positiv oder negativ von GCs reguliert (Galon et al. 2002). Die Vermittlung der genomischen Effekte erfolgt über den GC-Rezeptor (GR), welcher zur

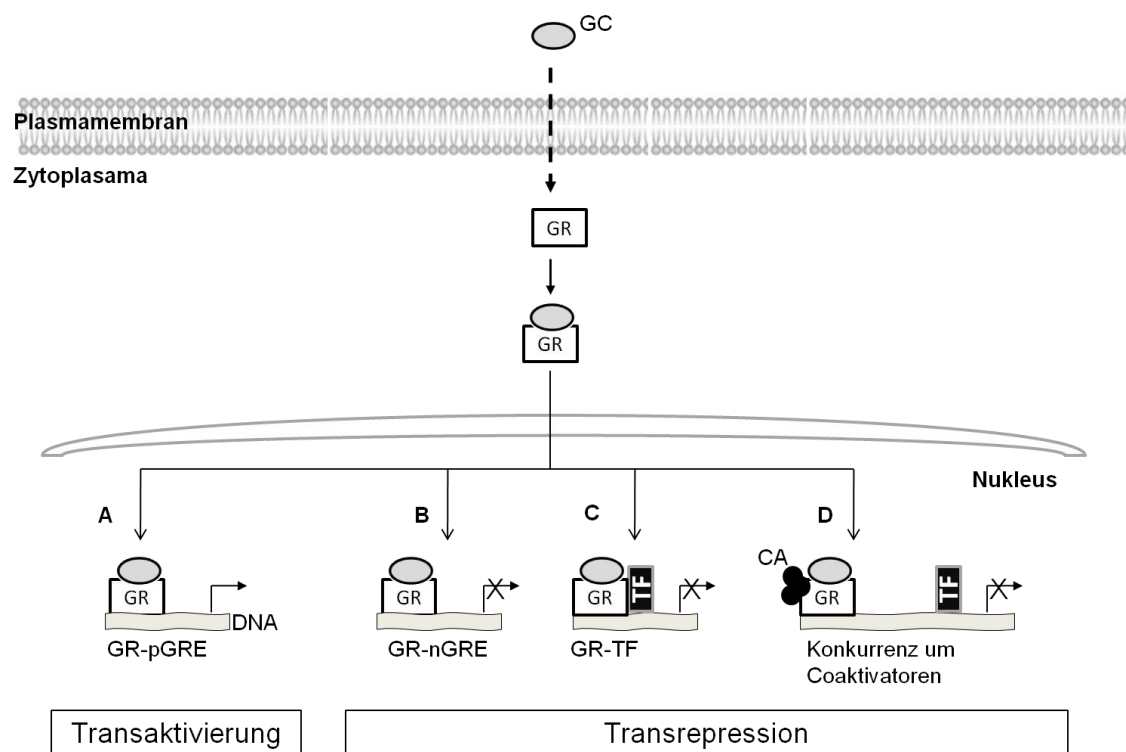
Klasse der Steroidhormonrezeptoren, einer Unterfamilie der nukleären Rezeptoren, gehört. Drei Isoformen des GR sind mittlerweile bekannt, die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Isoform. Aufgrund der Dominanz der  $\alpha$ -Isoform wird bei folgenden Ausführungen auf sie fokussiert.

GR $\alpha$  liegt konstitutiv im Zytoplasma in inaktiver Form vor. Er ist Bestandteil eines Multimerkomplex mit mehreren Kinasen und (Co-) Chaperonen wie Hitzeschockproteinen (HSPs) (Pratt et al. 2004; Stahn et al. 2007). Die Bindung von GC an den GR führt zu Konformationsänderungen innerhalb des Multimerkomplexes. Protein-Protein-Wechselwirkungen werden geschwächt, GR dissoziiert aus dem Komplex und transloziert in den Nukleus (Pratt 1993; Terry et al. 2007), wo er auf unterschiedliche Weise die Expression von Genen modifiziert.

Zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen sind für die Regulation der Genexpression durch GR beschrieben worden. Der erste Mechanismus beginnt im Kern mit der Bildung eines GR-Homodimers. Dieser kann als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor direkt mit spezifischen DNA-Sequenzen, sog. *GR response elements* (GRE) und negativen GRE (nGRE) interagieren. Daraus resultiert die Aktivierung bzw. Inhibierung der Zielgen-Transkription. Dieser Mechanismus wird, wenn GR an positive GREs bindet, als „Transaktivierung“ bezeichnet und spielt vor allem bei der Regulation von inflammatorischen und regulatorischen Proteinen eine Rolle (Stahn und Buttgerit 2008).

Das zweite, auch als „Cross-talk“ oder „Transrepression“ bezeichnete, Wirkprinzip ist in der Regel GRE unabhängig. Es basiert auf Protein-Protein-Wechselwirkungen von GR-Monomeren mit anderen Transkriptionsfaktoren, wodurch ihre transkriptionale Aktivität von GR moduliert wird. Diese Wechselwirkungen sind für Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B (McKay und Cidlowski 1998) und Aktivator-Protein (AP)-1, die in die Regulation von proentzündlichen Genen involviert sind, beschrieben (Heck et al. 1994; De Bosscher et al. 2003). Die transkriptionsregulatorische Wirkung von GR kann allerdings auch durch zwei weitere Mechanismen vermittelt werden. Zum einen wurde gezeigt, dass GR die Synthese von I $\kappa$ B, einem NF $\kappa$ B-Inhibitor, induziert, wodurch NF $\kappa$ B verstärkt daran gehindert wird in den Kern zu translozieren (Stahn et al. 2007; Stahn und Buttgerit 2008). Zum anderen kann es im Kern zu einer kompetitiven Situation um nukleäre Coaktivatoren zwischen dem GR-Homodimer und anderen Transkriptionsfaktoren kommen (Stahn et al. 2007; Stahn und Buttgerit 2008), wodurch die Aktivität der anderen Transkriptionsfaktoren beeinträchtigt wird. Die antientzündliche Wirkung der GCs wird vor allem der Transrepression zu geschrieben (Muzikar et al. 2009).

Darüber hinaus hat eine Vielzahl von Experimenten, dass es neben dem klassischen, relativ langsamen Weg der GC-vermittelten genomischen Regulation auch andere Möglichkeiten der Einflussnahme geben muss, durch die die schnellen Effekte erklärt werden können. Dabei wird u. a. die Interkalation von hochdosiertem GC mit der Zytoplasmamembran diskutiert, wodurch die physiochemischen Eigenschaften der Membran als auch die Aktivität membranassoziierter Proteine verändert werden (Buttgereit und Scheffold 2002; Buttgereit et al. 2004).



**Abb. 6: Schematische Darstellung der genomischen Regulation durch GCs.**

GC dringt mittels passiver Diffusion in die Zelle ein und bindet an GR im Zytoplasma. Der GC-GR-Komplex transloziert in den Nukleus, wo er entweder (A) an positive GRE bindet und die Transkription des Zielgens aktiviert (Transaktivierung) oder (B, C, D) die Transkription negativ beeinflusst (Transrepression). Dies kann durch (B) das Binden des Komplexes an negative GRE, (C) Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren sowie (D) durch das Konkurrieren um nukleäre Coaktivatoren geschehen. CA: Coaktivator; GC: Glucocorticoid; GR: Glucocorticoidrezeptor; pGRE: positives GRE; nGRE: negatives GRE; TF: Transkriptionsfaktor (modifiziert nach Lowenberg et al. 2007; Stahn und Buttgereit 2008)

## V Zielsetzung

Aufgrund des effizienten Einsatzes von IVIg und Corticosteroiden bei der Behandlung von vor allem B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen und einer Anhäufung von Hinweisen, dass eine Dysregulation des B-Zell-aktivierenden Faktors BAFF mit der Entstehung und der Progression vieler dieser Erkrankungen assoziiert ist, bestand das Ziel dieser Arbeit in der Beleuchtung der Modulation dieses Zytokins in Monozyten, den Hauptproduzenten, durch die beiden Wirkstoffgruppen. Dadurch sollte zum einen ermöglicht werden, neue Wirkungsmechanismen dieser beiden Wirkstoffgruppen zu identifizieren. Zum anderen sollte dadurch weitere Mechanismen der BAFF-Regulation charakterisiert werden. Beides würde zu einem besseren Verständnis dieses komplexen Systems beitragen und neue Angriffspunkte für BAFF-Antagonisten aufzeigen.



## VI Material & Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

0,5 M TRIS-Puffer pH 6,8	Biorad, München, D
1,5 M TRIS-Puffer pH 8,8	Biorad, München, D
100 bp DNALadder	New England Biolabs, Frankfurt aM, D
6 $\alpha$ -Methylprednisolon	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Agarose	Bioline, Luckenwalde, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	SERVA, Heidelberg, D
Bromphenolblau	Neolab, Heidelberg, D
Budesonid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
CellLytic Reagent M	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
completeMini EDTAfree protease inhibitor cocktail	Roche, Mannheim, D
Coomassie Brilliant Blue R250-Lösung	Biorad, München, D
Cytofix/Cytoperm	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Destilliertes Wasser (A. dest)	B. Braun, Melsungen, D
Dexamethason	Calbiochem, Merck, Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, D
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe, D
dNTP Mix, 10 mM	Fermentas, Invitrogen, Carlsbad, USA
Essigsäure (100 %)	Merck, Darmstadt, D
Ethanol, reinst	J. T. Baker, Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Ethanol, vergällt, 96 %	Fisher, Saarbrücken, D
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ficoll-Paque TM Plus	GE Healthcare, Freiburg, D
Fötales Kälberserum (fetal calf serum = FCS)	Hyclone, Invitrogen, Carlsbad, USA
Gamunex® (10 % IVIg)	Talecris, Frankfurt, D
Gentamycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glyzin	Carl Roth, Karlsruhe, D

Glyzin-Lösung (99,5 %)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Hyperladder I	Bioline, Luckenwalde, D
Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )	Provitro, Berlin, D
Isopropanol	Riedel de Häen, Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Jodacetamid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt, D
Lipopolysaccharid (LPS, von E. coli)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol, reinst	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Mifepriston (RU-486)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, D
N-Diluent (Verdünnungspuffer für Nephelometrie)	Siemens Healthcare, Erlangen, D
Octagam® (5 %)	Octapharma, Langenfeld, D
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer	Fermentas, Invitrogen, Carlsbad, USA
Papain (10 mg/mL)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Perm/Wash-Lösung	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Photoentwickler	Agfa, Leverkusen, D
Photofixierer	Agfa, Leverkusen, D
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe, D
Prestained Pageruler Protein Plus ladder	Fermentas, Invitrogen, Carlsbad, USA
QuantiFast™ SYBR® Green	Roche, Mannheim, D
RevertAid™ Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu\text{L}$ )	Fermentas, Invitrogen, Carlsbad, USA
RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/ $\mu\text{L}$ )	Fermentas, Invitrogen, Carlsbad, USA
Roti®-Quant 5 x	Carl Roth, Karlsruhe, D
Rotiphorese® NF Acrylamid (37,5 : 1)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Rotiphorese® SDS-Laufpuffer, 10x	Carl Roth, Karlsruhe, D
RPMI 1640-Medium (enthält 2 mM stabiles Glutamin)	PAN Biotech, Aldenbach, D
Salzsäure (10 N, rauchend)	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Sandoglobulin® (5 %)	CSL Behring, Marburg, D
Taq-Polymerase	Fermentas, Invitrogen, Carlsbad, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Trichloressigsäure (TCA)	Applichem, Darmstadt, D

TRIS-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, D
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tumonekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ )	CellSystems, St. Katharinen, D
Tween20	Merck, Darmstadt, D
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D

## 1.2 Verbrauchsmaterial

0,2 mL-Reaktionsgefäße	GreinerBioOne, Frickenhausen, D
0,5 mL-Reaktionsgefäße	Nerbe Plus, Winsen/Luhe, D
1,5 mL-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, D
Amicon Ultra-15 (Ultrafiltrationseinheiten)	Millipore, Schwalbach/Taunus, D
Cellstar® 75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	GreinerBioOne, Frickenhausen, D
Cellstar® Plastikpipetten (5, 10, 25 mL)	GreinerBioOne, Frickenhausen, D
Cellstar® TC-Platte mit 96 Vertiefungen, U-Form	GreinerBioOne, Frickenhausen, D
Cellstar® Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen	GreinerBioOne, Frickenhausen, D
Cellstar® Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen	GreinerBioOne, Frickenhausen, D
CryoTube™ Einfrierröhrchen (1,8 mL)	Nunc, Langenselbold, D
FACS-Messröhrchen (0,5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Falcon-Gefäße (15, 25 mL)	Becton Dickinson (BD), Heidelberg, D
Gewebekulturschalen mit Nocken (94 mm)	GreinerBioOne, Frickenhausen, D
Halbmikro-Küvetten (d = 10 mm)	VWR, Darmstadt, D
HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR Säule	Pharmacia/GE Healthcare, Freiburg, D
HiTrap Protein A HP-Säule (5 mL)	Pharmacia/GE Healthcare, Freiburg, D
HiTrap Protein G HP-Säule (5 mL)	Amersham Biosciences, GE Healthcare, Freiburg, D
Hybond ECL Nitrozellulose Membran	Biorad, München, D
Mikrotestplatte mit 96 Vertiefungen, flacher Boden, unsteril	Sarstedt, Nümbrecht, D
Minisart Sterilfilter (Ø 0,45 µm; 0,2 µm)	Sartorius, Göttingen, D
NAb™ Protein L Spin Column (5 mL)	Pierce/Perbio Science, Bonn, D
Neubauer improved Zählkammer	Brand, Wertheim, D
Polykarbonat-Kapillaren für LightCycler	Genaxxon, Ulm, D
Protean Blotpapier	Biorad, München, D
Servapor-Dialyseschlauch (Ø: 16 mm)	Serva, Heidelberg, D
S-Monovette® 7,5 mL Z (Serumröhrchen)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterile Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe Plus, Winsen/Luhe, D

### 1.3 Geräte

ÄKTA™ FPLC	Pharmacia/GE Healthcare, Freiburg, D
AutoMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
BN ProSpec® (Photometer für Nephelometrie)	Siemens Healthcare, Erlangen, D
Consort EV231 (Spannungsquelle)	Sigma Aldrich, Taufkirchen D
Cylcer T personal (PCR-Cycler)	Biometra, Göttingen, D
FACS Calibur (Durchflußzytometer)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Hettich Universal 32 R Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen, D
Image Master VDS (Geldokumentationssystem)	Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Freiburg, D
Inverses Lichtmikroskop MBL 3100	Krüss Optronik, Hamburg, D
LightCycler (Realtime-PCR Cycler)	Roche, Mannheim, D
MiniProtean TetraCell	Biorad, München, D
MultiskanEx	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D
My Cycler (Thermal Cycler)	Biorad, München, D
Peristaltikpumpe P-1	Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Freiburg, D
pH-Meter CG 820	Schott, Mainz, D
Pipettierhilfe (Pipet Boy)	Integra Biosciences, Fernwald, D
Präzisionswaage	Fischer Waagen, Goslar, D
SmartSpec Photometer	Biorad, München, D
Sterilbank (ClassII Type A/B3)	Nuaire, Plymouth, USA
Stickstofftank	Air Liquide, Düsseldorf, D
Sysmex KX-21N	Sysmex, Norderstedt, D
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
TransBlot SD Semidry	Biorad, München, D

## 1.4 Biochemische und Molekularbiologische Kits

CD14 <sup>+</sup> -Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Nucleospin RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
ProteoJET Cytoplasmic and Nuclear Protein Isolation Kit	Fermentas, Invitrogen, Carlsbad, USA
ProteoJET Membrane Protein Isolation Kit	Fermentas, Invitrogen, Carlsbad, USA
QIAquick DNA extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
Quantikine human BAFF/BlyS ELISA	R&D Systems, WI-Nordenstadt, D
Supersignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Biorad, München, D

## 1.5 Zelllinien

**Tab. 1: verwendete Zelllinien**

Name	Zelltyp	Bezugsquelle
U937	Histiozytisches Lymphom, Human	AG Prof. K. T. Preissner, Abteilung Biochemie des Uniklinikums Giessen
HL-60	Akute myeloide Leukemie, Human	
THP-1	Akute monozytäre Leukemie, Human	

## 1.6 Antikörper

### 1.6.1 Primärantikörper

BAFF	Kaninchen anti human, polyklonal	AbD serotec, Düsseldorf, D
BAFF (Atto488)	Ratte anti human, monoklonal	Axxora, Lörrach, D
Calnexin	Maus anti human, monoklonal	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
CD 14 (PerCP- Cy5.5)	Maus anti human, monoklonal	BD Pharmingen, Heidelberg, D
GAPDH	Maus anti human, monoklonal	Millipore, Schwalbach/Taunus, D
Histon H4	Maus anti human, monoklonal	Cell Signaling, NEB, Frankfurt, D
Isotyp (Atto488)	Ratte IgG2a	Axxora, Lörrach, D
Isotyp (PerCP- Cy5.5)	Maus IgG2b	BD Pharmingen, Heidelberg, D
β-Tubulin	Maus anti human, monoklonal	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D

### 1.6.2 Sekundärantikörper

Ziege anti Kaninchen (HRP)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Esel anti Maus (HRP)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D

## 1.7 Primer

**Tab. 2: verwendete Primer**

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
CD16_603f	5'-TGTCAACCATCTCATCATTC-3'
CD16_770r	5'-GAGGGTCCTTTCTCCATTT-3'
CD32b_421f	5'-CTTTCTGAGTGGCTGGTG-3'
CD32b_598r	5'-GGTTTGCTTGTGGGATGGA-3'
CD64_39f	5'-AGTTGATGGGCAAGTGGAC-3'
CD64_203r	5'-GTGATTCTGTAGCTGGGG-3'
BAFF_277f	5'-CTCCACGGAAGGAAAGCC-3'
BAFF_522r	5'-TCTGGACCCTGAACGGCAC-3'
BAFF_319f	5'-CACGGTGGTGTCTTTCTAC-3'
BAFF_494r	5'-GAGCTGGTGGTTCAAAGAT-3'
GAPDH_f	5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3'
GAPDH_r	5'-ATCTGCCGTCCAGTCCAGGTG-3'
GAPDH_537f	5'-GATCATCAGCAATGCCTCC-3'
GAPDH_697r	5'-CATCAGCCACAGTTTCCC-3'

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer basieren auf Sequenzen humanen Ursprungs.

## 1.8 Software

ÄKTA™ Unicorn	Pharmacia/GE Healthcare, Freiburg, D
Ascent	ThermoFisher Scientific, Langenselbold, D
CellQuest®	BD Pharmingen, Heidelberg, D
WinMDI	The scripps research institute, La Jolla, CA, USA
PrimerPremier	Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA
LightCycler®, Version 1.5	Roche, Mannheim, D
GraphPad Prism	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
ImageJ	NIH, Bethesda, MD, USA
Promoter Database	CSHL, Cold Harbor, NY, USA

## 2. Methoden

### 2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.1.1 Kultivierung von Zellen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich um die immortalisierten, humanen Zelllinien U937, THP-1 und HL-60. Sie sind monozytären Ursprungs und wachsen als Suspensionskulturen. Des weiteren wurden Primärkulturen von frisch isolierten Monozyten verwendet.

Die immortalisierten Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen, die primärisolierten Monozyten in Kulturplatten mit 24 Vertiefungen bei 37 °C in feuchter, 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (Standardbedingungen) kultiviert.

<i>Kulturmedium für immortalisierte Zellen:</i>	RPMI 1640 (enthält 2 mM stabiles Glutamin) 10 % Fötale Kälberserum (FCS) 5 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
---	--

<i>Kulturmedium für Primärzellen:</i>	RPMI 1640 (enthält 2 mM stabiles Glutamin) 10 % FCS 25 µg/mL Gentamycin
---------------------------------------	---

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen an einer dafür vorgesehenen Werkbank (Nuaire) durchgeführt. Alle in der Zellkultur verwendeten Lösungen und Materialien waren steril um jegliche Kontamination der Zellen zu vermeiden. Damit eine Kontamination mit Mycoplasmen ausgeschlossen werden konnte, wurden die Kulturen regelmäßig mittels einer PCR-basierten Detektionsmethode (Minerva Biolabs) getestet.

#### 2.1.2 Langzeitlagerung von Säugerzellen – Einfrieren und Auftauen

Zur zeitlich unbefristeten Aufbewahrung von immortalisierten Zellen ist die Kryokonservierung ein typisches Verfahren. Das verwendete Einfriermedium verhindert eine Lyse der Zellen während des Einfrier- und Auftauvorgangs. Zum Einfrieren wurden die Zellen mit einer Pipette aus der Kulturflasche in ein 15 mL-Gefäß überführt. Die



Zellsuspension wurde zentrifugiert (4 min, 230 x g, Raumtemperatur (RT)) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 mL Einfriermedium resuspendiert, auf zwei Kryoröhrchen verteilt und für 24 Stunden (h) bei - 80 °C in Isopropanol gelagert. Das Isopropanol gewährleistet eine schonende Abkühlung der Zellen, da es eine Abkühlrate von 1 °C/min hat. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen ist es wichtig, die Zellen schnell aufzutauen, da das im Einfriermedium enthaltenen DMSO zytotoxisch wirkt. Dazu wurde vor dem Auftauen der Zellen vorgewärmtes Medium in ein 15 mL-Gefäß vorgelegt. Die aufzutauenden Zellen wurden in 37 °C warmes Wasserbad gehalten bis sich fast alle Eiskristalle gelöst hatten. Dann wurden die Zellen mit einer Pipette in das vorbereitete Gefäß überführt, mit dem vorgelegten Medium durchmischt und zentrifugiert (4 min, 230 x g, RT). Um das zytotoxische DMSO zu entfernen wurde das Zellpellet in einem größeren Volumen Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert (4 min, 230 x g, RT). Danach wurde das Zellpellet in 5 mL Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>, 15 mL Medium) überführt. Die Zellen wurden bei Standardbedingungen (37°C, 5 %, CO<sub>2</sub>) für 24 h kultiviert, dann wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

*Einfriermedium zur Kryokonservierung:*            10 % (v/v) DMSO in FCS

### **2.1.3 Mediumwechsel, Zellpassage und Zellernte**

Zur Passage wurden die Zellen alle 2-3 Tage durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren durchmischt, in ein 15 mL-Gefäß überführt und zentrifugiert (4 min, 230 x g, RT). Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in vorgewärmten Medium aufgenommen. Entsprechend der benötigten Zelldichte wurde 1/5- bis 1/20stel der Zellen zurück in die Kulturflasche gegeben, und bei Standardbedingungen weiter kultiviert.

Zur Zellernte wurde das Zellpellet nach der Zentrifugation in phosphatgepufferter Salzlösung (1x PBS) resuspendiert und zentrifugiert (4 min, 230 x g, RT), um das Kulturmedium komplett zu entfernen. Das Pellet wurde in entsprechender Lösung resuspendiert und je nach Verwendungszweck weiter verarbeitet.

<i>10x PBS-Puffer:</i>	1,45 M NaCl 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 24,17 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O Gelöst in 1 L A. dest; pH auf 7,2-7,35 einstellen
------------------------	---

<i>1x PBS-Puffer:</i>	10 % (v/v) 10x PBS; ad A. dest 1 L
-----------------------	------------------------------------

### 2.1.4 Primärkulturen

Primärkulturen sind nicht immortalisierte Zellkulturen, die direkt aus einem Gewebe oder Organ gewonnen werden. Entscheidende Unterschiede zur Dauerkultur sind die begrenzte Lebensdauer und das Auftreten typischer Veränderungen während des Kulturverlaufs.

Die Isolation humaner Monozyten erfolgte aus frischen *buffy coats* gesunder Blutspender des Instituts für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Giessen. Alle Blutspender stimmten einer Verwendung überschüssigen Materials ihrer Blutspende zu wissenschaftlichen Zwecken zu.

Zunächst wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) gesunder Probanden mittels Dichtezentrifugation gewonnen. Hierfür wurde das unter sterilen Kautelen entnommenen Blut aus einem *buffy coat* (ca. 80 mL) in drei sterile 50 mL-Gefäße verteilt und mit je 30 mL 1x PBS vermischt. In vier weitere sterile 50 mL-Gefäße wurden je 15 mL Ficoll-Paque (Dichte 1,077 g/mL; GE Healthcare) vorgelegt und anschließend mit ca. 45 mL des Blut-PBS-Gemischs vorsichtig überschichtet. Danach erfolgte eine Zentrifugation (30 min, 360 x g, RT) ohne Bremse. Durch die Zentrifugation wurden Zellen mit einer höheren Dichte (Erythrozyten, Granulozyten) am Boden pelletiert, während sich mononukleäre Zellen in der Interphase zwischen Plasma und Separationsmedium anreicherten. Dieser Interphasering wurde anschließend mit einer Pasteurpipette entnommen und in zwei 50 mL-Gefäße überführt. Beide Gefäße wurden mit 50 mL 1x PBS auf 50 mL aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, 460 x g, RT). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets aufgerüttelt und in 50 mL 1x PBS aufgenommen. Es folgten eine Zentrifugation (10 min, 80 x g, RT) und ein erneuter Waschschrift. Anschließend wurden die Zellpellets in 5 mL Separationspuffer suspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis aufbewahrt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot (10 µL) entnommen und mit 1x PBS 1:10 verdünnt. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 1–5 x 10<sup>8</sup> Zellen eingestellt.

<i>Separationspuffer für AutoMACS:</i>	1x PBS
	2 mM EDTA
	0,5 % (w/v) BSA

Die Aufreinigung der CD14<sup>+</sup>-Zellen aus den zuvor isolierten PBMCs wurde mit Hilfe von CD14<sup>+</sup>-*Microbeads* (Miltenyi Biotec) erreicht. Das Prinzip dieser Trennungsmethode beruht auf der magnetischen Markierung von CD14<sup>+</sup>-Zellen mit Hilfe von Antikörper-gekoppelten *Microbeads*. Die Zellsuspension mit den markierten Zellen wird auf eine mit Eisenkügelchen gefüllte Trennsäule geladen, an der ein starkes elektromagnetisches Feld aufgebaut wird. Die markierten Zellen werden in diesem elektromagnetischen Feld festgehalten, wohingegen die unmarkierten Zellen die Säule ungehindert passieren können. Nach Entfernung der Magnetisierung können die Monozyten als CD14<sup>+</sup>-Zellfraktion von der Säule eluiert werden. Es handelt sich bei dieser Trennungsmethode um eine sogenannte positive Selektion.

1–5 x 10<sup>8</sup> PBMCs wurden mit 100-500 µL *Microbeads* in einem 15 mL-Gefäß vermischt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 Volumen Separationspuffer dazu gegeben und das Gemisch zentrifugiert (5 min, 300 x g, RT). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 0,5-2,5 mL Separationspuffer aufgenommen. Die positive Selektion der Zellen wurde am *AutoMACS* (Miltenyi Biotec) unter Verwendung des Programms „Pssel“ durchgeführt. Nach der Aufreinigung wurde aus der positiven Fraktion ein Aliquot (10 µL) zur Bestimmung der Zellzahl entnommen und 1:10 mit 1x PBS verdünnt. Die anschließende Zellzählung erfolgte mit Hilfe des automatischen Hämatologieanalysators Sysmex KX-21N (*Sysmex*). Die Zellen wurden auf 8 x 10<sup>6</sup> Zellen/mL verdünnt und in Kulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät. Dazu wurde 0,75 mL Medium in jede Vertiefung vorgelegt und je 0,25 mL Zellsuspension dazu pipettiert, um ein Endvolumen von 1 mL pro Vertiefung und eine Zellzahl von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/mL zu erhalten. Die Zellen wurden nach der Isolierung über Nacht im Inkubator bei Standardbedingungen inkubiert, bevor sie am nächsten Tag stimuliert wurden.

### 2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl von immortalisierten Zellkulturen wurde eine Neubauer-Zählkammer (improved) verwendet. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4 min, 230 x g, RT) und das Pellet in Medium resuspendiert. Dann wurde das Deckglas ordnungsgemäß auf der Zählkammer angebracht, so dass es sich nicht mehr verschieben ließ. Die korrekte Anbringung ist die Voraussetzung für eine exakte Berechnung der Zellzahl, weil dadurch ein definierter Raum von  $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ }\mu\text{L}$  pro Großquadrat geschaffen wird.

Die Zellen wurden mit 1x PBS in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß verdünnt (1:10-1:80) und anschließend mit einer Pipette auf die Zählkammer aufgetragen. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen in allen 4 Großquadraten mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops (Krüss) bei 10facher Objektivvergrößerung gezählt und die Zellzahl pro mL durch folgende Formel errechnet:

$$\text{Zellen pro mL} = \frac{\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnung} \times 10^4}{4}$$

Zur Bestimmung der Zellzahl während und nach der Isolierung primärer Zellen wurde der vollautomatisierte Hämatologieanalysator *SYSMEX KX-21N* (Sysmex) verwendet. Diese Testmethode basiert auf der Messung der unterschiedlichen elektrischen Leitfähigkeiten von Blut und Verdünnungsflüssigkeit. Des weiteren wird mittels Vorwärtsstreuung und 90°-Streulichtmessung des eingestrahnten Lichts eine Diskriminierung der Zellpopulationen vorgenommen.

### 2.1.6 Kontrolle der Zellvitalität

Die Zellvitalität von Zellkulturen wurde in regelmäßigen Abständen durch Färbung von Zellen mit Trypanblau kontrolliert, um auszuschließen, dass etwaige Effekte durch Apoptose der Zellen verursacht werden. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der nur in Zellen mit defekter Membran eindringen kann. Tote Zellen werden dunkelblau gefärbt, vitale Zellen bleiben ungefärbt. Zur Durchführung dieser Färbung wurden die Zellen aus einer Kulturflasche zentrifugiert (4 min, 230 x g, RT) und das Pellet in Medium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden 10  $\mu\text{L}$  entnommen und in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß pipettiert, anschließend mit 1 Volumen Trypan-Blau-Lösung vermischt und auf die Zählkammer aufgebracht. Wie oben beschrieben wurde die Gesamtzahl der Zellen pro mL sowie der prozentuale Anteil an blauen (= toten) Zellen bestimmt.

*Trypan-Blau-Färbelösung:*

0,4 % (w/v) Trypan-Blau gelöst in 1x PBS

Des weiteren wurde zur Kontrolle der Zellvitalität die 7-AAD-Färbung eingesetzt. 7-AAD (= 7-Aminoactinomycin D) ist ein Peptid mit der Grundstruktur von Actinomycin. Es kann nur in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen und besitzt interkalierende Eigenschaften. Durch die Interkalation mit der DNA verändert sich sein Fluoreszenzcharakter. Aufgrund dieser Eigenschaften wird er zur Diskriminierung toter Zellen in der Durchflusszytometrie eingesetzt. Um eine 7-AAD-Färbung durchzuführen, werden die geernteten Zellen ein Mal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend werden sie in FACS-Puffer gewaschen (s. Durchflusszytometrie, S. 34f) und mit einer 7-AAD-Färbelösung (BD Pharmingen; Endkonzentration: 0,125 µg/Test) für 10 min bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit FACS-Puffer wurden 10.000 Zellen pro Probe am Durchflusszytometer FACS *Calibur* bei 650 nm detektiert (s. Durchflusszytometrie S. 37f).

### **2.1.7 Stimulation von immortalisierten Zellen**

Aus einer laufenden Zellkultur wurden Zellen abzentrifugiert und anschließend die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer (improved) bestimmt. Je nach Verwendung wurde die Zellzahl auf  $2 \times 10^5 - 3 \times 10^6$  Z/mL (Ausgangszellzahl) verdünnt und in die vorbereiteten Kulturschalen bzw. -platten verteilt. Nach Zugabe der entsprechenden Stimulanzien folgte die Inkubation der Zellen im Inkubator bei Standardbedingungen für entsprechende Zeiträume (bei den jeweiligen Versuchen beschrieben).

## **2.2 Immunologische Nachweismethoden**

### **2.2.1 Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting)**

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers können verschiedene physikalische Eigenschaften der in einer Zellsuspension enthaltenen Zellen analysiert werden. Dazu werden die Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet und ihre relative Granularität, ihre relative Größe oder ihre relative Fluoreszenzintensität gemessen. Diese Informationen werden durch ein optisch-elektronisches System erfasst.

In dieser Arbeit wurden durchflusszytometrische Messungen zur Bestimmung der Reinheit von Primärisolaten sowie zur Detektion der Expression verschiedener membrangebundener und intrazellulärer Proteine und zur Analyse des 7-AAD-Apoptose-Assays angewendet.

### 2.2.2 Nachweis membrangebundener Proteine mittels Durchflusszytometrie

Nach der Zellstimulation wurden die Zellen geerntet und ein Mal mit 1x PBS gewaschen, um Medienbestandteile zu entfernen. Die Zellpellets wurden danach in FACS-Puffer aufgenommen und je 100 µL in die Vertiefungen einer Kulturplatte mit 96 Rundvertiefungen pipettiert. Nach einer Zentrifugation (4 min, 230 x g, 4 °C) wurden die Zellen mit einem Atto488-makierten anti-BAFF-Antikörper (13,3 µg/mL, Axxora) und einem PerCP-Cy5.5-makierten anti-CD14-Antikörper (10 µg/mL, BD Pharmingen) für 20 min bei 4 °C inkubiert. Die optimale Konzentration war für die verwendeten Antikörper in vorangegangenen Experimenten mittels Titration des Antikörpers bestimmt worden. Anschließend wurden jeder Vertiefung 50 µL FACS-Puffer zugesetzt und die Platte zentrifugiert (4 min, 230 x g, 4 °C). Ein weiterer Waschschrift mit 100 µL FACS-Puffer folgte. Die Zellpellets wurden in 100 µL FACS-Puffer resuspendiert und in Messröhrchen mit 100-200 µL FACS-Puffer überführt. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometer die geometrisch-gemittelten Fluoreszenzintensitäten (GMean) der Proben gemessen. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper auszuschließen, wurde bei den Messungen für jeden Antikörper Isotyp-Kontrollen mitgeführt. Isotyp-Antikörper sind Immunglobuline, die aus der gleichen Spezies wie der Ziel-Antikörper gewonnen werden und der gleichen Immunglobulin-Subklasse angehören. Für den anti-BAFF-Antikörper wurde ein Atto488-markierter Ratte IgG<sub>2a</sub>-Isotyp (Axxora), für den anti-CD14-Antikörper ein PerCP-Cy5.5-markierter Maus IgG<sub>2b,k</sub>-Isotyp (BD Pharmingen) verwendet. Die Isotyp-Kontrollen wurden in der gleichen Konzentration wie ihre Ziel-Antikörper eingesetzt. Nach der Messung wurden die GMean-Werte der Isotyp-Kontrollen von den jeweiligen GMean-Werten der Ziel-Antikörper abgezogen, wodurch die Differenz (Delta, d) des GMean der Proben errechnet wurde:

$$dGMean = GMean_{Ziel-Antikörper} - GMean_{Isotyp}$$

Die Messung der Proben wurden mit Hilfe der *Cellquest*-Software, die Auswertung der Daten mittels *WinMDI*-Software durchgeführt. Der Cut-Off für die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten liegt bei 10<sup>1</sup> auf der X-Achse (Darstellung der Fluoreszenzintensität): Liegt die Fluoreszenzintensität zwischen 10<sup>0</sup> und 10<sup>1</sup>, gilt die Probe als negativ für den Antikörper, d. h. die Zellen exprimieren keine nachweisbaren Mengen des Antigens. Ist die

Fluoreszenzintensität größer als  $10^1$ , gilt die Probe als positiv. Je stärker die Fluoreszenzintensität, umso weiter rechts liegt die Kurve.

*FACS-Puffer:*

1x PBS  
10 % (v/v) FCS  
0,1 %  $\text{NaN}_3$

### 2.2.3 Nachweis von intrazellulären Proteinen mittels Durchflusszytometrie

Nach der Zellstimulation wurden die Zellen geerntet und ein Mal mit 1x PBS gewaschen um das Medium zu entfernen. Die Zellpellets wurden danach in FACS-Puffer aufgenommen und je 100  $\mu\text{L}$  in die Vertiefungen einer Kulturplatte mit 96 Rundvertiefungen pipettiert. Für den Nachweis intrazellulärer Protein müssen die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert werden, damit die Antikörper die Zellmembran passieren und im Zellinneren an die Proteine binden können. Da die Zellpermeabilisierung mit Saponin ein sehr schonendes und reversibles Verfahren ist, müssen die Zellen während der gesamten Aufarbeitung in einem saponinhaltigen Puffer gelöst sein.

In dieser Arbeit wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{L}$  einer saponin- und formaldehydenthaltenden Fixier- und Permeabilisierungs-Lösung (*Cytofix/Cytoperm*, BD Pharmingen) für 20 min bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit einer saponinhaltigen Waschlösung (1x *Perm/Wash*-Puffer, BD Pharmingen) folgte eine 30minütige Inkubation (4 °C, im Dunkeln) mit den Fluoreszenz-markierten Antikörpern (s. Nachweis membrangebundener Proteine mittels Durchflusszytometrie, S. 37f), die in je 50  $\mu\text{L}$  saponin-haltiger Waschlösung zu den Zellen gegeben wurden. Nach der Inkubation wurden erneut 50  $\mu\text{L}$  saponin-haltige Waschlösung in jede Vertiefung pipettiert und die Platte zentrifugiert (4 min, 230 x g, 4 °C). Es folgten zwei Waschschrritte mit je 100  $\mu\text{L}$  saponin-haltiger Waschlösung und anschließender Aufnahme der Zellen in 100  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer. Die Zellsuspension wurde in vorbereitet Messröhrchen überführt und bis zur Messung am Durchflusszytometer bei 4 °C im Dunklen aufbewahrt.

Messung und Auswertung wurden durchgeführt wie bereits für den Nachweis membrangebundener Proteine mittels Durchflusszytometrie beschrieben (s. S. 37f).

### 2.2.4 Enzymgekoppeltes Immunadsorptionsassay (ELISA)

ELISA ist eine sehr sensitive Methode zur quantitativen Konzentrationsbestimmung von Biomolekülen, z. B. Zytokinen, in Flüssigkeiten. Der in dieser Arbeit verwendete ELISA-Test ist ein Sandwich-ELISA: Die Oberfläche einer Mikrottestplatte wird mit einem spezifisch gegen das interessierende Antigen gerichteten, Antikörper beschichtet und die zu analysierende Probe dazugegeben. Das in der Probe enthaltene Antigen wird von dem immobilisierten Antikörper gebunden. Ein weiterer, ebenfalls für das Antigen spezifischer, Antikörper wird dazugegeben, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Nach Zugabe des Enzymsubstrates findet eine Farbreaktion statt, die durch die Herabsetzung des pH-Wertes gestoppt wird. Die Menge des gebundenen Antigens ist proportional zur Farbintensität und wird indirekt durch Messung der Absorption bestimmt.

In dieser Arbeit wurden die BAFF-Konzentrationen der Kulturüberstände mit dem *Quantikine human BAFF/BLyS ELISA* (R&D Systems) bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben: Die Proben wurden aufgetaut, aus dem BAFF-Standard wurden zwei parallele Verdünnungsreihen angelegt. In jede Vertiefung der 96 Mikrottestplatte wurde 100 µL *Assay diluent* vorgelegt und 75 µL Kulturüberstand, Standard oder Verdünnungslösung der Standards (*Blank*) pipettiert. Nach einer 2 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden alle Vertiefungen vier Mal mit Waschpuffer gewaschen. In jede Vertiefung wurde 200 µL Konjugat pipettiert und erneut für 2 h bei RT inkubiert. Es folgten vier Waschschrte und die Zugabe von 200 µL frisch zubereiteter Substratlösung zu jeder Vertiefung. Während einer Inkubation für 30 min bei RT im Dunkeln fand eine Farbentwicklung statt, die mit 50 µL 2 N Schwefelsäure beendet wurde. Innerhalb von 30 min wurde die Absorption in einem Photometer (*MultiskanEX*, Thermo Fisher Scientific) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Zusätzlich wurde eine zweite Messung mit einer Referenzwellenlänge von 540 nm durchgeführt. Aus den erhaltenen Rohdaten konnte mit der *Ascent*-Software (Thermo Fisher Scientific) die Standardgerade erstellt sowie die BAFF-Konzentrationen der Kulturüberstände errechnet werden.



## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Isolierung von Proteinen aus humanen Zellen

Um Proteine aus Zellen isolieren zu können müssen die Zellen zuvor aufgeschlossen werden. Für diese Arbeit wurde dazu ein nicht-mechanisches Aufschlussverfahren gewählt. Mit dem Zellaufschluss geht die Freisetzung von Proteasen einher, die zu einer Degradation der Proteine führen. Daher wurde zu dem Aufschlusspuffer Protease-Inhibitoren zugegeben.

Die Zellen wurden nach der Zellernte und einmaligem Waschen mit 1x PBS in 350  $\mu$ L Lysepuffer (*CellLytic Reagent M*, Sigma) aufgenommen. Der Lysepuffer war vor der Zugabe zu den Zellen mit Serin- und Zystein-Protease-Inhibitoren (*completeMini EDTAfree protease inhibitor cocktail*, Roche) komplementiert worden. Die Zellen wurden schüttelnd für 15 min bei 25 °C in dem Lysepuffer lysiert. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 11.000 x g, 4 °C) wurden die Überstände in frische 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und entweder sofort weiterverwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

### 2.3.2 Trennung und Isolierung von Membran- und Zytoplasmaproteinen aus humanen Zellen

Für die Untersuchung der Expression von Proteinen im Zytoplasma von Zellen müssen diese von den Proteinen der anderen Zellkompartimente abgetrennt werden.

In dieser Arbeit wurden die Membran- und Zytoplasmaproteine von immortalisierten humanen Zellen mit Hilfe des *ProteoJET Membrane Protein Extraction Kit* (Fermentas) isoliert. Die diesem Kit zugrunde liegende Methode beruht auf einer differentiellen, schrittweisen Solubilisierung der Proteine. Die Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen, milden, nicht-denaturierenden Detergenzien führt zu einer selektiven Trennung von Membranen und membranassoziierten Proteinen von der zytoplasmatischen Proteinfraction. Die Zellen werden zunächst permeabilisiert, um die Zytoplasmaproteine freizusetzen. Die Zelltrümmer werden dann mit Membranprotein-Extraktionspuffer versetzt, der selektiv die Integral- und membranassoziierten Proteine löst und sie als separate Fraktion isoliert.

Die Fraktionierung der Proteine wurde nach modifiziertem Herstellerprotokoll durchgeführt. Zunächst wurden alle Lösungen mit Protease-Inhibitoren (*completeMini EDTAfree protease inhibitor cocktail*, Roche) versetzt. Für die Isolierung wurden die Zellen ( $5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  Zellen/Probe) zentrifugiert (5 min, 250 x g, 4 °C) und zwei Mal mit 2 mL eiskalten 1x PBS

gewaschen (5 min, 250 x g, 4 °C). Die Zellpellets wurden je nach Größe in 0,5-1 mL eiskalten Permeabilisierungspuffer aufgenommen, kurz durchmischt und 30 min bei 4 °C schüttelnd (800 rpm) im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Um die Zytoplasma- von der Membranfraktion zu trennen, wurde eine Zentrifugation (15 min, 16.000 x g, 4 °C) durchgeführt. Die Überstände (= Zytoplasma-Proteine) wurden in frische 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und direkt weiterverwendet oder bis zur Weiterverwendung bei – 80 °C aufbewahrt. Die Pellets (= Membranproteine) wurden in 0,5 mL eiskalten Membranprotein-Extraktionspuffer aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren darin vollständig gelöst. Nach einer 60 minütigen Inkubation, schüttelnd (1400 rpm) im Thermomixer (Eppendorf), bei 4 °C folgte ein Zentrifugationsschritt (15 min, 16.000 x g, 4 °C) zur Reinigung der Extrakte. Die Überstände (= Membranproteine) wurden in frische 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und sofort weiterverwendet oder bis zu Weiterverwendung bei – 80 °C aufbewahrt.

### **2.3.3 Trennung und Isolierung von Kern- und Zytoplasmaproteinen aus humanen Zellen**

Um die Expression von Proteinen im Zellkern (Nukleus) zu untersuchen, müssen diese von den Proteinen anderer Zellkompartimente getrennt werden.

In dieser Arbeit wurden die Kern- und Zytoplasmaproteine von immortalisierten humanen Zellen mit Hilfe des *ProteoJET Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit* (Fermentas) isoliert. Die Durchführung erfolgte nach modifiziertem Herstellerprotokoll. Vor Beginn der Isolierung wurden die zu verwendenden Lösungen (im Kit enthalten) mit Protease-Inhibitoren (*completeMini EDTAfree protease inhibitor cocktail*, Roche) und Dithiothreitol (DTT) komplementiert. Dann wurden die Zellen (ca.  $5 \times 10^6$  Zellen/Probe) zentrifugiert (5 min, 250 x g, 4 °C) und ein Mal mit 1x PBS gewaschen (5 min, 250 x g, 4 °C). Mittels einer Pipette wurde das Pelletvolumen bestimmt und 10 Volumen des Zelllysepuffer zugeführt. Die Zellsuspension wurde für 10 Sek durchmischt. Darauf folgte eine 10minütige Inkubation auf Eis. Um die Zytoplasmafraktion von den Kernproteinen zu trennen wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 500 x g, 4 °C). Der Überstand (= Zytoplasmafraktion) wurde in ein frisches 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und erneut zentrifugiert (15 min, 20.000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und sofort weiterverwendet oder bis zur Weiterverwendung bei - 80 °C aufbewahrt. Das Kern-Pellet wurde in der Zwischenzeit auf Eis aufbewahrt und anschließend zwei Mal mit 500 µL

Waschpuffer gewaschen. Dazu wurde es nach Zugabe des Kern-Waschpuffers kurz durchmischt, für 2 min auf Eis aufbewahrt und dann zentrifugiert (10 min, 500 x g, 4 °C). Die Überstände wurden jeweils verworfen. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 120 µL eiskalten Kernaufbewahrungspuffer durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren gelöst. Um die Kerne zu lysieren wurde 1/10tel Volumen Kernlyse-Reagenz zugesetzt und die Lösung kurz durchmischt. Es folgte eine Inkubation von 30 min, schüttelnd (1200 rpm) im Thermomixer (Eppendorf) bei 4 °C, sowie eine abschließende Zentrifugation (5 min, 20.000 x g, 4 °C). Der Überstand (= Kernproteine) wurde in ein frisches 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und sofort weiter verwendet oder bis zur Weiterverwendung bei – 80 °C aufbewahrt.

## **2.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

### **2.3.4.1 Kolorimetrisch**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen kann auf verschiedene Weisen erfolgen. In dieser Arbeit wurde sie mit dem sogenannten *Bradford*-Test unter Verwendung der *Roti®-Quant*-Reagenz (Carl Roth) durchgeführt. Diese sensitive Methode der kolorimetrischen Konzentrationsbestimmung beruht auf der Überführung des Farbstoffs (Coomassie Brilliant Blue-G250) vom kationischen in den anionischen Zustand, einhergehend mit einer Veränderung der Absorption. Die Absorptionsänderung ist proportional zur Proteinkonzentration und kann bei einer Wellenlänge von 595 nm erfasst werden. Für die genaue Konzentrationsbestimmung wird bei jeder Messung eine Eichgerade erstellt. Dazu wird eine Verdünnungsreihe von einer BSA-Lösung definierter Konzentration angefertigt.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Standards und Proben wurden in Duplikaten angelegt. Dazu wurde 50 µL Standard bzw. Probe in Vertiefungen einer Testplatte mit 96 Vertiefungen (flacher Boden, Sarstedt) pipettiert. 2 Volumen *Roti®-Quant* 5x-Lösung wurde mit 5,5 Volumen A. dest in einem 15 mL-Gefäß vermischt. Die Proben wurden vorher mit A. dest 1:10-1:80 verdünnt. Je 200 µL vorbereitete Bradfordreagenz wurde zu den vorgelegten Standards und Proben pipettiert. Nach einer 5minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln konnte die Absorptionsmessung bei 595 nm am ELISA-Plattenlesegerät (*MultiskanEx*, ThermoFisher Scientific) erfolgen. Die Erstellung der Eichgerade und die Berechnung der Konzentrationen wurden unter Verwendung der *Ascent*-Software (ThermoFisher Scientific) durchgeführt.

#### 2.3.4.2 Nicht-kolorimetrisch

Alternativ zur Absorptionsmessung im sichtbaren Bereich kann die Proteinkonzentration auch über die Absorption im UV-Bereich abgeschätzt werden. Bei dieser Methode nutzt man die Absorption der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin bei 280 nm. Eine exaktere Konzentrationsbestimmung eines reinen Proteins ist dann möglich, wenn der Absorptionskoeffizient dieses Proteins bei einer definierten Wellenlänge bekannt ist. Für IgG beispielsweise gilt, dass eine 0,1 %ige Lösung eine Absorption von  $A_{280\text{nm}} = 1,4$  aufweist. In dieser Arbeit wurde die nicht-kolorimetrische Konzentrationsbestimmung verwendet, um den ungefähren IgG-Gehalt der eluierten Fraktionen der Protein G-Säulenchromatographie zu bestimmen. Dazu wurden die eluierten Fraktionen der Protein G-Säulenchromatographie unverdünnt in Halbmikroküvetten aus Kunststoff (10 mm Schichtdicke, VWR) pipettiert und die Absorption im Photometer (*SmartSpec*, Biorad) bei 280 nm gemessen.

#### 2.3.4.3 Nephelometrisch

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Eigenschaft von Immunkomplexen, einfallendes Licht zu streuen. Die Lichtstreuung verhält sich dabei proportional zur Anzahl der Immunkomplexe und des Grades ihrer Vernetzung. Für diese Messungen wird monochromatisches Licht eingesetzt, das durch einen Laser erzeugt wird. Dieses wird auf die in der Lösung enthaltenen Immunkomplexe gelenkt und von diesen gestreut. Das Streulicht kann dann mit Hilfe von Photodetektoren gemessen und quantifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde die Nephelometrie zur Konzentrationsbestimmung von IgG in humanem Serum sowie in Immunglobulin-Präparaten verwendet. Dazu wurden die Proben gegebenenfalls mit *N-Diluent* (Siemens) in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß verdünnt und mittels eines Photometers (BN *ProSpec*®, Siemens) gemessen.

### 2.3.5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Bei dieser Methode zur Analyse von Proteingemischen werden die Proteine nach ihrer Molekularen Masse in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bindung der Proteine an Natriumdodecylsulfat (SDS) führt neben der Bildung negativ geladener Komplexe zur Protein-Denaturierung und verhindert Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstrukturen).

Für diese Arbeit wurde ausschließlich das diskontinuierliche Lämmli-System mit TRIS-Glyzin-Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) verwendet. Ein solches System besteht aus einem Sammelgel mit geringer Polyacrylamidkonzentration, das ein Trenngel mit höherem Polyacrylamidgehalt überschichtet. Aufgrund der geringen Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel ist das entstehende Netzwerk großporig, wodurch der Siebeffekt entfällt und die Proteine konzentriert (gesammelt) werden. Im Trenngel ist das Netzwerk wegen der höheren Polyacrylamidkonzentration engmaschiger, weshalb die Proteine nach ihrer Molekularen Masse aufgetrennt werden. Die Polymerisation der Acrylamid-Lösungen wird durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) gestartet. Tetramethylethylendiamin (TEMED) fungiert dabei als Katalysator.

Zur Vorbereitung der Gele wurden zwei Glasplatten mit Ethanol und anschließend mit A. dest gereinigt. Die Glasplatten wurden in einer Gel-Gießvorrichtung (Biorad) zusammengebaut und mit A. dest auf ihre Dichtigkeit geprüft. Nach Entfernung von A. dest wurden die vorbereiteten Gel-Lösungen (s. S. 45) zwischen die Glasplatten gefüllt: erst die Trenngel-Lösung, die ca. 2/3tel des gegossenen Gels ausmachte. Um eine glatte obere Kante zu erhalten wurde das Trenngel für die Dauer der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt. Dann folgte das Einfüllen der Sammelgel-Lösung und das Einsetzen des Probenauftragskamms. Nachdem auch das Sammelgel vollständig auspolymerisiert war, wurden die fertigen Gele in eine Gelelektrophorese-Apparatur (Biorad) platziert. Alle Zwischenräume wurden mit 1x SDS-Laufpuffer (Carl Roth) gefüllt.

*Gellösungen (für 10 mL Gel):*

	Trenngel (in mL)		Sammelgel (in mL)
	10 %	12 %	5 %
H <sub>2</sub> O	4	3,3	6,8
30 % Acryl/Bisacrylamid	3,3	4	1,7
1,5 M TRIS pH 8,8	2,5	2,5	-
0,5 M TRIS pH 6,8	-	-	1,25
10 % SDS	0,1	0,1	0,1
10 % APS	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,004	0,004	0,01

*1x SDS-Laufgel:*

10 % (v/v) 10x SDS-Laufpuffer

Zur Probenvorbereitung wurden die errechnete Proteinmenge in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß mit 6x SDS-Ladepuffer vermischt und 5 min bei 95 °C schüttelnd (400 rpm) im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert, wodurch eine Denaturierung der Proteine erfolgte. Anschließend wurden die Proben nach einer kurzen Zentrifugation (1 min, 300 x g, RT) mit einer Hamilton-Spritze (Hamilton) in die Taschen gefüllt. Das in dem Ladepuffer enthaltenen Glyzin sorgte für das Absinken der Proben in den Probentaschen.

*6 x Proteinladepuffer:*

0,375 M TRIS pH 6,8  
 55 % Glyzin  
 12 % SDS  
 0,5 M β-Mercaptoethanol  
 0,002 % Bromphenolblau

Um die molekulare Masse der aufgetrennten Proben bestimmen zu können, wurde neben den Proben ein Protein-Größenstandard (*Prestained Pageuler Protein Plus*, Fermentas) aufgetragen. Anschließend wurde das elektrische Feld angelegt:

*Programm für SDS-PAGE:*

Programmstufe	Spannung (V)	Zeit (min)
1	90	30
2	120	75 - 90

### 2.3.6 Färben von SDS-Gelen

Eine Standardmethode zum Färben von Proteingelen ist die Coomassie-Färbung. Sie wird angewendet um die Vollständigkeit des Transfers der Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulose-Membran zu überprüfen.

Um die Gele anzufärben wurden sie 30 min in einer Coomassie Brilliant Blue R250-Lösung (Biorad) bei Raumtemperatur inkubiert. Da der Farbstoff unspezifisch alle Proteine sowie den Gelhintergrund färbt, wurden die Gele über Nacht mit Entfärber-Lösung soweit entfärbt, dass die Proteine als blaue Banden sichtbar blieben. Zur Dokumentation wurden die Gele an einem Computer eingescannt.

<i>Coomassie-Entfärber-Lösung:</i>	20 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure

### 2.3.7 Western-Analyse von Proteinen (Western Blot)

Um spezifische Proteine in einem Proteingemische nachweisen zu können ist der Western Blot eine sehr sensitive Methode. Es handelt sich dabei um einen sog. Immunoblot, d. h. Proteine können unter Verwendung spezifischer Antikörper mittels einer immunologischen Reaktion nachgewiesen werden. Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden auf eine Membran übertragen, wo sie für weitere Reaktionen zugänglicher sind als im Gel.

Hat der Proteintransfer von Gel auf Membran stattgefunden, werden die unspezifischen Bindestellen der Membran mit einem Blocker abgesättigt. Darauf folgen die Zugabe des spezifischen Antikörpers, dem sog. Primärantikörper, und die Zugabe des Sekundärantikörpers, der mit einem Enzym konjugiert ist. Letzterer bindet an den Primärantikörper. Durch Zugabe einer Substratlösung (Luminol), die von dem konjugierten Enzym (Merrettichperoxidase, HRP) des Sekundärantikörpers umgesetzt werden kann, entsteht ein Chemilumineszenz-Signal. Dieses Signal führt zu einer Bande, die auf einem Röntgenfilm die Position des Antigens sichtbar macht.

In dieser Arbeit wurde für die Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulosemembran (GE Healthcare) das *Semidry-Blot*-System (Biorad) verwendet. Zur Vorbereitung wurden Filterpapier und Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Gel, Filterpapier und Membran wurden für einige Minuten mit Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde alles zwischen Anode und Kathode in folgender Reihenfolge platziert: Anode – Filterpapier – Membran – Gel – Filterpapier – Kathode. Dabei wurde darauf

geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den Schichten befanden. Dann wurde das elektrische Feld angelegt und die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen.

<i>Transferpuffer:</i>	10 % (v/v) 10x SDS-Laufpuffer
	20 % (v/v) Methanol
	mit A. dest auffüllen

<i>Programm für Proteintransfer:</i>	Stromstärke	Spannung	Zeit
	(mA)	(V)	(min)
	300 - 450	25	50

Um die Qualität des Transfers auf der Membran zu visualisieren wurde eine Ponceau-Färbung durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine reversible Reaktion durch die unspezifisch alle Proteine auf der Membran sichtbar werden. Dazu wurde die Membran für wenige Minuten in einer Gelfärbeschale mit 1 mL Ponceau-Lösung bedeckt, welche anschließend mit H<sub>2</sub>O entfernt wurde. Bei einem erfolgreichen Transfer waren dann zahlreiche Proteinbanden auf der Membran zu sehen.

<i>Ponceau S-Färbelösung:</i>	0,25 % (w/v) Ponceau S
	0,3 % (v/v) Trichloressigsäure
	Mit A. dest auffüllen

Der Ponceau-Färbung folgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen der Membran mit 1 % Magermilch-TBS-Tween-Lösung (TBST) für 1 h bei RT. Im Anschluss wurde die Membran mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in einer 1 %igen Magermilch-TBST-Lösung über Nacht bei 4 °C bzw. 1 h bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit TBST-Puffer. Die Membran wurde dann für 1 h mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert und wieder drei Mal gewaschen.

<i>10x TBS (TRISgepufferter Saline)-Puffer:</i>	1 M Tris
	1,5 M NaCl
	6 % (v/v) 10 N HCl
	In A. dest lösen, pH auf 7,5 einstellen



<i>TBST-Puffer:</i>	10 % (v/v) 10x TBS 0,1 % (v/v) Tween20 0,5 % (w/v) BSA
<i>1 % Magermilch-TBST:</i>	1 % (w/v) Magermilch in TBST gelöst

Für den Nachweis der enzymatischen Chemielumineszenz (ECL) wurde das *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* von Biorad nach Herstellerangabe verwendet. Die Membran wurde mit der ECL-Lösung (1 Volumen Peroxidlösung und 1 Volumen Luminol-/Verstärkerlösung) 5 min inkubiert. Im Anschluss wurde das Chemilumineszenz-Signal auf einen Röntgenfilm übertragen und durch Entwicklung und Fixierung (Agfa, Düsseldorf) visualisiert.

<i>Entwicklerlösung für Röntgenfilme:</i>	50 % (v/v) A. dest 25 % (v/v) Lösung A 2,5 % (v/v) Lösung B 2,5 % (v/v) Lösung C Mit A. dest auf 1 L auffüllen; lichtgeschützt aufbewahren
<i>Fixierlösung für Röntgenfilme:</i>	60 % (v/v) A. dest 20 % (v/v) Lösung A 5 % (v/v) Lösung B Mit A. dest auf 1 L auffüllen; lichtgeschützt aufbewahren

### 2.3.7.1 Auswertung der Western-Analysen

Die entwickelten Filme der Membranen wurden in einen Computer eingescannt. Mit Hilfe des Programms „ImageJ“ (NIH) wurde die Intensität der Banden berechnet und die relativen Expressionsunterschiede analysiert. Dazu wurde innerhalb einer Probe die Bandenintensität (I) des Zielproteins mit der Bandenintensität des Referenzproteins ermittelt und der Quotient (Ratio) daraus gebildet:  $\text{Ratio} = I_{\text{Zielprotein}} / I_{\text{Referenzprotein}}$ . Anschließend wurde der relative Unterschied zwischen unstimulierter und stimulierter Probe berechnet:

$$\text{Relativer Expressionsunterschied (\%)} = \text{Ratio}_{\text{stimulierte Probe}} * 100 / \text{Ratio}_{\text{unstimulierten Probe}}$$

## 2.4 Fraktionierung von Fab- und Fc-Fragmenten aus Immunglobulinen

### 2.4.1 Verdau von Immunglobulin mit Papain

Immunglobuline sind hochmolekulare Strukturen bestehend aus einem Fc-Fragment und zwei Fab-Fragmenten, die mittels Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Verbindung zwischen den Fab- und Fc-Fragmenten kann enzymatisch durch Papain oder Pepsin aufgespalten werden. Bei dem Verdau mit Papain entstehen aus einem Immunglobulin-G-Molekül (IgG) zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Wird IgG mit Pepsin verdaut, entsteht ein F(ab')<sub>2</sub>-Fragment und mehrere Fc-Fragmentteile. Da es für diese Arbeit wichtig war von beiden Fraktionen intakte Fragmente zu erhalten wurde das IgG mit Papain verdaut. Dazu wurde zunächst Intravenöses Immunglobulin (= IVIg; *Gamunex*®) über Nacht gegen große Volumina 1x PBS mit Hilfe eines Dialyseschlauchs dialysiert, um enthaltenen Faktoren, die eventuell den Verdau stören könnten zu entfernen. Anschließend wurde das IVIg mit Papain (10 mg/mL) und Verdaupuffer in einem 50 mL-Reaktionsgefäß gemischt und 1 h bei 37 °C im Wasserbad verdaut. Dann wurde 80 mg Jodacetamid dazugegeben um die Verdaureaktion zu stoppen (modifiziertes Protokoll nach Prof. F. Nimmerjahn). Zur Kontrolle der Verdaueffizienz wurde eine kleine Probe des Verdaus (20 µL) in einem 10 %igen Gel mittels SDS-Page (s. SDS-PAGE, S. 44f) aufgetrennt und mit Coomassiefärbung visualisiert (s. Färben von SDS-Gelen, S. 46f).

<i>Verdauansatz für Papainverdau (30 mL):</i>	15	mL	IVIg
	13,5	mL	Verdaupuffer <sup>A</sup>
	1,5	mL	Papain

<sup>A</sup> <i>Verdaupuffer:</i>	20	mL	1x PBS
	1,8	mL	0,5 M EDTA
	160	mg	EDTA

## 2.4.2 Chromatographische Verfahren

### 2.4.2.1 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie, auch Gelpermeationschromatographie genannt, werden gelöste Proteine nach ihrem Stokes-Radius aufgetrennt. Das Trennmedium besteht aus quervernetzten, hydrophilen Makromolekülen, wie Sephacryl. Es wird entsprechend seines Molekulargewichtsbereiches gewählt. Seine Poren sind so klein, dass hochmolekulare Protein nicht in die Matrix eindringen können und dadurch in der Pufferlösung außerhalb der Matrix bleiben. Kleine Moleküle dagegen, die in das Gel diffundieren können, werden erst später von der Säule eluiert.

Zur Auftrennung des IVIg-Verdaus wurde eine Säule hochauflösendem Sephacryl-Säule (HiPreP Sephadex 16/60 S-200 HR) verwendet. Sephacryl besteht aus einem N,N'-Methylen-Bisacrylamid vernetzten Dextran, dessen Quervernetzung von hoher mechanischer Stärke ist. Die Trennsäule wurde an ein ÄKTA™FPLC-System mit Auto-Probensammler angeschlossen. Mittels eines im FPLC-System enthaltenen UV-Detektionssystems und der ÄKTA™Unicorn-Software wurde die UV-Absorption der Probe im Verlauf der Versuchsdurchführung dokumentiert. Damit der Lauf am Monitor verfolgt werden kann, muss das gesamte System frei von Luftblasen sein. Alle Puffer und Proben müssen vor Verwendung steril filtriert (Poren-Ø: 0,2 µm) werden, um zu verhindern das Kristalle oder andere größere Partikel die Dichtungen oder Schläuche verstopfen.

Nach dem die Säule mit einem Säulenvolumen (120 mL) 1x PBS equilibriert worden war, wurde 2 mL des IVIg-Verdaus mit einer Spritze in das System eingeleitet. Die Probe wurde mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 mL/min über die Säule gepumpt und der Verlauf mittels UV-Absorption verfolgt. Die aus der Säule austretende Flüssigkeit wurde mit in einem Auto-Probensammler in 2 mL-Fraktionen gesammelt. Im Anschluss wurden zur Kontrolle Proben von den proteinhaltigen Fraktionen in einem 10 %igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (s. SDS-PAGE, S. 44f) und mittels Coomassie-Färbung visualisiert (s. Färben von SDS-Gelen, S. 46). Die Fraktionen der einzelnen Peaks wurden in einem Probenröhrchen gesammelt und aufkonzentriert (s. Aufkonzentrierung von Proteinlösungen, S. 54f). Fraktionen, die noch unverdautes IVIg enthielten, wurden nachverdaut (Ansatz wie Verdaus, s. S. 49). Die Fraktionen, die kein unverdautes IVIg enthielten, wurden zur weiteren chromatographischen Auftrennung eingesetzt. Nach Beendigung der Auftrennung wurde die Säule mit A. dest gespült und mit 20 % Ethanol bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.4.2.2 Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf einer spezifischen, reversiblen Interaktion zwischen Stoffen einer stationären und einer mobilen Phase. Bei der Säulenchromatographie entspricht das Säulenfüllmaterial der stationären, die vorbeifließende Lösung der mobilen Phase.

#### 2.4.2.2.1 Affinitätschromatographie mit Protein A-Säule

Protein A aus *Staphylococcus aureus* bindet reversibel Immunglobuline über ihren Fc-Teil. Das 42 kDa große Protein besteht aus sechs Regionen, fünf davon mit hoher Fc-Bindfähigkeit; 1 M Protein A kann 2 M IgG binden. Bei der hierzu verwendeten *HiTrap Protein A HP*-Säule liegt das Protein kovalent an Agarosekügelchen gebunden, immobilisiert in der Säule vor.

Um Fab- von Fc-Fragmenten zu trennen wurde nach der Größenausschlusschromatographie die Affinitätschromatographie mittels Protein A-Säule eingesetzt. Um den Verlauf der Auftrennung mittels UV-Absorption zu verfolgen wurde die Trennsäule an ein ÄTKA™FPLC-System angeschlossen. Wie bei der Größenausschlusschromatographie wurden alle Puffer und Lösungen vor Verwendung steril filtriert (Ø: 0,2 µm) und das System luftblasenfrei gehalten. Nach Equilibrierung der Säule mit Bindepuffer wurde 2 mL Probe mit Hilfe einer Spritze in das Flüssigkeitssystem eingeführt. Zunächst wurde weiterhin Equilibrierungspuffer über die Trennsäule geleitet, um ungebundene Probe (= Fab-Fragmente) herauszuwaschen. Anschließend wurde mittels eines Puffergradienten der Elutionspuffer auf die Säule gepumpt, um die gebundene Probe (= Fc-Fragmente) zu eluieren. Der Durchfluss als auch das Eluat der Säule wurden mittels Auto-Probensammler in 1 mL-Fractionen gesammelt. Um den niedrigen pH-Wert des Elutionspuffers zu neutralisieren wurde in jede Elutions-Fraktion 200 µL 1 M Tris-Puffer pH 8,5 pipettiert, damit die enthaltenen Fc-Fragmente nicht denaturiert wurden. Im Anschluss wurden Proben der interessanten Fraktionen in einem 10 %igen Gel mittels SDS-PAGE (s. SDS-PAGE, S. 44f) aufgetrennt und mit Hilfe von Coomassie (s. Färben von SDS-Gelen, S. 46) visualisiert. Die Fraktionen der Elution wurden in einem Probenröhrchen gesammelt und aufkonzentriert (s. Aufkonzentrierung von Proteinlösungen, S. 54f), damit sie zur weiteren chromatographischen Auftrennung eingesetzt werden konnten.

<i>Bindepuffer:</i>	1 M Glyzin, gelöst in A. dest; eingestellt auf pH 9
<i>Elutionspuffer:</i>	1 M Glyzin, gelöst in A. dest; eingestellt auf pH 2
<i>1 M TRIS-Puffer:</i>	1 M TRIS, gelöst in A. dest, eingestellt auf pH 8,5

#### **2.4.2.2.2 Affinitätschromatographie mit Protein L-Säule**

Protein L ist ein bakterielles Protein, das von *Peptostreptococcus magnus* stammt. Im Gegensatz zu Protein A und G interagiert es mit den Fab-Domänen von IgG, da es an die leichten Kappa-Ketten des Moleküls bindet. Wie Protein A ist es bei der in dieser Arbeit verwendeten Trennsäule (*Protein L NAb™ Spin Column*, 5 mL) an Agarosekügelchen immobilisiert. Die Auftrennung mit dieser Trennsäule erfolgt mittels Zentrifugation, da es sich um eine Zentrifugen-Säule handelt. Die Durchführung der Auftrennung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Nach Equilibrierung der Säule mit 1x PBS wurde die aufkonzentrierte Probe im Verhältnis 1:5 mit 1x PBS vermischt und auf die Säule pipettiert. Die Säule wurde an beiden Enden fest verschlossen und 15 min bei RT schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die ungebundene Probe mittels Zentrifugation (1 min, 1000 x g, RT) in einem frischen Probenröhrchen gesammelt. Nach zwei Waschschritten mit je 10 mL Bindepuffer (1 min, 1000 x g, RT) wurden die gebundenen Probenbestandteile in drei Zentrifugationsschritten mit 5 mL Elutionspuffer (s. Protein A, oben) eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden jeweils sofort mit 5 mL 1 M TRIS-Puffer neutralisiert. Anschließend wurde zur Kontrolle pro Fraktion eine Probe von 10 µL in einem 10 %igen SDS-Gel (s. SDS-PAGE, S. 44f) aufgetrennt und mit einer Coomassie-Färbung visualisiert (s. Färbung von SDS-Gelen, S. 46f).

#### 2.4.2.2.3 Affinitätschromatographie mit Protein G-Säule zur Aufreinigung von Immunglobulin G aus humanem Serum

Um Immunglobulin G (IgG) aus humanem Serum aufzureinigen, stehen mehrere Liganden für die Affinitätschromatographie zur Verfügung. Entscheidend bei der Auswahl des geeigneten Liganden ist das Spektrum der IgG-Subklassen, das aufgereinigt werden soll.

Da für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche alle IgG-Subklassen benötigt wurden, fand die Aufreinigung mittels Protein G statt. Protein G ist ein bakterielles, 30-35 kDa großes Protein, das aus *Streptococcus* isoliert wird. Im Gegensatz zu Protein A, einem anderen bakteriellen Ligand mit Einsatz in der Affinitätschromatographie, bindet Protein G alle IgG-Subklassen mit hoher Affinität. Die reversible Bindung von IgG erfolgt über den Fc-Teil der Antikörper. Natives Protein G bindet neben IgG auch Albumin, eine typische Verunreinigung in Serum. Zur Vermeidung einer gleichzeitigen Aufreinigung von Albumin wurde ein rekombinantes Protein G als Ligand verwendet. Es handelt sich dabei um ein in *E. coli* produziertes, 17 kDa großes Molekül, bei dem die Albuminbindestelle gentechnisch deletiert wurde. Bei der hier verwendeten *HiTrap Protein G HP*-Säule liegt das rekombinante Protein G, kovalent an Agarosekügelchen gebunden, immobilisiert in der Säule vor.

In dieser Arbeit wurde die Affinitätschromatographie mit einer Protein G-Säule eingesetzt um IgG aus humanem Serum zu isolieren. Zur Vorbereitung wurden alle verwendeten Lösungen sowie die Proben filtriert (0,45 µm Porendurchmesser), um eventuelle Präzipitate die die affinitätschromatische Auftrennung stören könnten zu entfernen.

Um humanes Serum zu erhalten wurde drei gesunden Blutspendern, die einer Verwendung ihres Blutes zu Forschungszwecken zugestimmten, 45-120 mL Blut in 7,5 mL-Serumröhrchen (Sarstedt) entnommen. Die Röhrchen wurden zentrifugiert (10 min, 4000 rpm, RT) und das Serum anschließend in ein 50 mL-Gefäß überführt. Nephelometrisch konnte eine durchschnittliche IgG-Konzentration der Seren von 12,4 mg/mL ermittelt werden (s. Nephelometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen, S. 43). Daraufhin wurden die Seren im Verhältnis 1:3 mit Bindepuffer (s. S. 52) verdünnt. Die Säule wurde mit 4 Säulenbettvolumen Bindepuffer unter Verwendung einer Peristaltik-Pumpe (Pharmacia Biotech) equilibriert. Anschließend wurde das Serum-Puffer-Gemisch unter Berücksichtigung der IgG-Bindekapazität der Affinitätssäule (max. 120 mg) mit einer Flussrate von 5 mL/min auf die Säule aufgebracht. Das Eluat wurde aufgefangen und ein weiteres Mal auf die Säule auftragen, um die Menge des gebundenen IgG zu erhöhen. Ein darauffolgender Reinigungsschritt mit 6 Säulenbettvolumen Bindepuffer diente der Entfernung ungebundener Serumbestandteile.

Um das gebundene IgG von der Säule zu eluieren wurde die Säule mit 4 Säulenbettvolumen Elutionspuffer (s. S. 52) gespült, wobei das Eluat in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen als 1 mL-Fraktionen aufgefangen wurde. Damit die Aktivität des säurelabilen IgG erhalten werden konnte, wurde jedem Aliquot 150 µL 1 M TRIS-Puffer (pH 8,5) zugesetzt. Anschließend wurde die IgG-Konzentration der einzelnen Fraktionen photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm (*SmartSpec*, Biorad) bestimmt (s. photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen, S. 43) und die Fraktionen mit einer Absorption > 1,8 gesammelt. Für eine weitere Verwendung wurde das IgG aufkonzentriert (von ca. 7 mg/mL auf ca. 45 mg/mL) und der Puffer ausgetauscht (Durchführung s. Aufkonzentrierung von Proteinen, unten).

Die Affinitätssäule wurde nach Verwendung mit einem Säulenbettvolumen Elutionspuffer reequilibriert, dann mit 4 Säulenbettvolumen Bindepuffer gespült. Mit 20 % Ethanol befüllt, wurde sie bis zur nächsten Verwendung bei 4 ° C aufbewahrt.

### **2.4.3 Aufkonzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen**

Für eine Weiterverwendung des aufgereinigten IgG bzw. der IVIg-Fragmente musste eine Aufkonzentrierung sowie ein Pufferaustausch vorgenommen werden. Beides kann gleichzeitig mittels Ultrafiltration effektiv und zeitsparend umgesetzt werden. Dazu wurden *Amicon Ultra-15*-Ultrafiltrationseinheiten (Millipore, 10 NMWL) verwendet. Diese Einheiten beinhalten eine Zellulose-Membran, durch die während der Zentrifugation Moleküle bis zu einer bestimmten Größe hindurch wandern können. Moleküle mit einer großen molekularen Masse werden oberhalb der Membran gesammelt bzw. aufkonzentriert. Die Grenze der Durchlässigkeit wird durch die Größe der Membranporen determiniert.

Für die Aufkonzentrierung wurden 15 mL des aufgereinigten IgG bzw. der IVIg-Fragmente in die Ultrafiltrationseinheit überführt und in einem 50 mL-Gefäß zentrifugiert (30 min, 2450 x g, 20 °C). Der Durchfluss wurde verworfen, das in der Ultrafiltrationseinheit zurückgehaltene Volumen mit aufgereinigtem IgG bzw. IVIg-Fragmenten auf 15 mL aufgefüllt und erneut zentrifugiert (30 min, 2450 x g, 20 °C). Dieser Schritt wurde wiederholt, bis die gesamte Probe aufkonzentriert war. Anschließend wurde die Umpufferung durchgeführt. Dazu wurde die Ultrafiltrationseinheit mit 1x PBS befüllt und zentrifugiert (30 min, 2450 x g, 20 °C). Dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt, so dass das aufgereinigte IgG bzw. die IVIg-Fragmente schließlich in 1x PBS vorlag(en).

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 RNA-Isolierung aus Zelllinien

Da Ribonukleinsäure (RNA) sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse ist, wurden alle Arbeiten auf Eis und unter einem Chemikalienabzug durchgeführt. Außerdem wurde bei allen anzusetzenden Lösungen Wasser mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, RNase Inhibitor) verwendet. Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus immortalisierten Zellen wurde das *NucleoSpin® RNA II*-Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Zellen wurden nach der Zellernte ein Mal mit 1x PBS gewaschen. Um die Zellen zu lysieren, wurde das Pellet in 350 µL RA1-Puffer aufgenommen und gründlich durchmischt. Dieser Lysepuffer enthält 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol und Guanidinthiocyanat. Letzteres ist ein starkes Denaturierungsmittel, das zelluläre RNAsen inaktiviert. Das Zelllysate wurde in eine *NucleoSpin®*-Filtersäule übertragen und zentrifugiert (1 min, 11.000 x g, RT). Der Durchfluss wurde in einem Sammelgefäß aufgefangen und nach der Zentrifugation mit 350 µL Ethanol (70 %, RNase frei) vermischt. Das RNA-Ethanol-Gemisch wurde auf eine *NucleoSpin®*-RNA-Säule übertragen, diese in ein Sammelgefäß platziert, und zentrifugiert (1 min, 11.000 x g, RT), um die RNA an die Säule zu binden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß gestellt. Zur Entsalzung der Säule wurden 350 µL Entsalzungspuffer (= MDB-Puffer) aufgetragen und die Säule zentrifugiert (1 min, 11.000 x g, RT). Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde die Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit 95 µL DNase-Reaktionslösung für 15 min bei Raumtemperatur in der Säule verdaut. Es folgten ein Waschschriff mit 200 µL RA2-Puffer (30 s 11.000 x g, RT), ein Waschschriff mit 600 µL RA3-Puffer (30 s, 11.000 x g, RT) und ein Waschschriff mit 250 µL RA3-Puffer (2 min, 11.000 x g, RT). Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Nach dem letzten Waschschriff wurde die Säule in ein neues 1,5 mL-Sammelgefäß gesetzt. Um die RNA von der Säule zu eluieren wurde 40-60 µL RNase freies Wasser aufpipettiert und die Säule zentrifugiert (1 min, 11.000 x g, RT). Die isolierte RNA wurde für sofortige Weiterverwendung auf Eis oder für eine spätere Weiterverwendung bei – 80 °C gelagert.



### 2.5.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird über die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dabei entspricht eine Absorption von „1“ 50 µg/mL dsDNA, 30 µg/mL ssDNA und 40 µg/mL RNA. Die teilweise Überlagerung der Absorption von Nukleinsäuren bei 260 nm und von Proteinen bei 280 nm kann genutzt werden, um die Reinheit von Nukleinsäurepräparaten abzuschätzen. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  sollte bei einer proteinfreien Nukleinsäurelösung zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

In dieser Arbeit wurde die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration sowie der  $A_{260}/A_{280}$ -Ratio mit einem *SmartSpec*-Photometer (Biorad) unter Verwendung von Halbmikro-Küvetten (VWR) durchgeführt. Dazu wurde 20 µL einer mit A. dest verdünnten RNA- bzw. DNA-Probe in die Küvette überführt und die Absorptionen bei 260 und 280 nm gemessen. Die Konzentration wurde anschließend aus der Absorption bei 260 nm, der Verdünnung, und einem spezifischen Multiplikationsfaktor berechnet.

### 2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht *in vitro* enzymatisch millionenfache Kopien von definierten Nukleotidsequenzen zu synthetisieren. Dieser Vorgang wird als Amplifikation bezeichnet und macht selbst sehr geringe DNA-Mengen durch die Vervielfachung für weitere Analysen zugänglich.

In einem PCR-Ansatz sind synthetische DNA-Oligonukleotide (*Primer*) als Startermoleküle enthalten, die an die DNA binden. Des weiteren enthält ein PCR-Ansatz freie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's), die als Bausteine für die neuentstehenden DNA-Stränge dienen, eine für das Enzym geeignete Magnesium ( $Mg^{2+}$ )-Konzentration, geringe Mengen Ausgangs-DNA oder Komplementär-DNA (cDNA) sowie eine thermostabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase). Die Oligonukleotidprimer werden so gewählt, dass sie gegenläufig (komplementär) zum zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt binden. Von ihrem 3'-Ende aus wird der neue DNA-Doppelstrang durch die *Taq*-Polymerase synthetisiert und somit die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Reaktionsschritten: Er beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden Doppelstrangs, indem die DNA bei 95 °C 5 min aufgeschmolzen wird. Darauf folgt im zweiten Schritt die Primer-Hybridisierung (*Annealing*) an die einzelsträngigen DNA-Templates bei Temperaturen  $\geq 50$  °C. Die *Annealing*-

Temperatur ist von der Basenzusammensetzung des Hybridisierungsbereiches abhängig und kann mit folgender Formel errechnet werden:  $T_a = (4\text{ °C} \times G/C) + (2\text{ °C} \times A/T)$ . Im dritten Schritt, der Elongationsphase, findet die Synthese der zur Matrize komplementären DNA-Stränge bei 72 °C statt. Das entscheidende Prinzip der PCR basiert auf der zyklischen Wiederholung eines PCR-Zyklus, was zu einer exponentiellen Amplifikation der Matrize führt.

#### **2.5.4 Primer-Design**

Um Primer für die entsprechenden Nukleotidsequenzen zu gestalten wurde die *PrimerPremier*-Software verwendet. Bei der Wahl der Primer wurde darauf geachtet, dass sie eine Länge von 18-30 Nukleotiden und einen GC-Gehalt von 40-60 % haben. Die Nukleotid-Sequenz des gewünschten Gens wurde, soweit vorhanden, als *complete coding sequence* (cds) von der Webseite des „National Centre for Biotechnology Information“ (NCBI) in das *Primer-Premier*-Programm geladen und dort mit Hilfe des internen Suchalgorithmus nach geeigneten komplementären Primern gesucht. Die Synthese der am besten geeigneten Oligonukleotidprimerpaare wurde bei *Eurofins mwg Operon* in Auftrag gegeben. Die lyophilisierten Primer wurden bei Ankunft im eigenen Labor in RNase freiem Wasser gelöst, so dass eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von 100 pmol/μL entstand. Die Primer wurden bei – 20 °C gelagert.

#### **2.5.5 Verschiedene PCR-Techniken**

##### **2.5.5.1 Amplifikation von DNA**

Die Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen wurde zur Bestimmung der optimalen PCR-Konditionen der Primerpaare eingesetzt. Des weiteren wurde das Ausgangsmaterial für DNA-Standards, die in die quantitative Realtime-PCR eingesetzt wurden, synthetisiert.

Zur Durchführung einer PCR wurde in dieser Arbeit ein *Thermocycler* (*MyCycler*, Biorad) verwendet. Die optimalen Bedingungen, wie Anzahl der Zyklen, *Annealing*-Temperatur und Dauer der Synthese, wurden für jedes Primer-Paar etabliert, bevor es zur PCR mit Versuchsproben eingesetzt wurde.

<i>Standard-PCR-Ansatz für 25 µL:</i>	2	µg	cDNA
	2,5	µL	10x Puffer
	0,5	µL	dNTP's (10 mM)
	1	µL	f Primer (10 pmol/µL)
	1	µL	r Primer (10 pmol/µL)
	0,2	µL	Taq-Polymerase
	ad 25	µL	RNAse freies H <sub>2</sub> O

<i>Standard-Programm einer PCR:</i>	Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	} 35 Zyklen
	Denaturierung	94 °C	30 s	
	Annealing	Ta	30 s	
	Elongation	72 °C	45 s	
	Abschließende Elongation	72 °C	5 min	
	Abkühlung/Aufbewahrung	4 °C	∞	

### 2.5.5.2 RT-PCR

Da RNA nicht direkt als Template in eine PCR eingesetzt werden kann, muss sie zunächst mittels reverser Transkription in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben werden. Diese Methode bezeichnet man als Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR). Dabei wird zur Amplifikation der RNA das Enzym reverse Transkriptase eingesetzt.

Für die RT-PCR wurden ausschließlich Reagenzien von Fermentas verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Für einen 20 µL-Ansatz wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Sie wurde mit 1 µL Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer (0,5 µg/µL) in einem 0,5 mL-Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert und mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 12,5 µL aufgefüllt und durchmischt. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert (1 min, 230 rpm, RT) und bei 70 °C für 5 min im PCR-Cycler (*Cycler T Personal*, Biometra) inkubiert (Denaturierung). Der Reaktionsansatz wurde aus dem Cycler entnommen und auf Eis gestellt um die folgenden Reagenzien in selbiger Reihenfolge zuzufügen:

4	µL	5x Puffer
0,5	µL	RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor (20 U/µL)
2	µL	dNTP's (10 mM)

Nach Durchmischung und Zentrifugation wurde der Reaktionsansatz bei 37 °C für 5 min inkubiert und anschließend wieder auf Eis gestellt. Dann wurde 1 µL der Reversen Transkriptase (*RevertAid™ M-MuLV*, 200 U/µL) dazu pipettiert und bei 42 °C für 60 min im Cycler inkubiert (Elongation). Anschließend wurde die Reaktion durch eine Erhöhung der

Temperatur auf 70 °C für 10 min gestoppt. Die erhaltene cDNA konnte direkt für PCR-Amplifikationen eingesetzt oder bis zur Weiterverwendung bei – 20 °C aufbewahrt werden.

### 2.5.5.3 Quantitative Realtime-PCR

Das Ziel einer quantitativen PCR ist, aus der Menge des amplifizierten PCR-Produkts auf die (relative) Menge des eingesetzten RNA-Templates zu schließen. Dies wird durch Thermocycler möglich, die die Bildung von PCR-Produkten in „Echtzeit“, d. h. während ihrer Entstehung, erfassen können. Zusätzlich kommen Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz, die sich mit hoher Spezifität in doppelsträngige DNA einlagern. Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge wird der Ct-Wert (= *crossing point*) verwendet. Er entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen.

Voraussetzung für einen zuverlässigen quantitativen Nachweis ist eine funktionierende mRNA-Analytik. Für diese Arbeit wurde dazu die relative Quantifizierung angewendet. Bei dieser Methode wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes *housekeeping*-Gen (HKG) bezogen. Die Vorteile dieser Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, weil Fehler in der RT-PCR oder Gewebeeffekte innerhalb einer Probe beide Gene, Ziel- und Referenzgen, in gleichem Maße betreffen. Die genaueste Form der mRNA-Quantifizierung stellt die Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung dar. Dabei wird zunächst die relative Expression des Zielgens in einer behandelten Probe auf eine unbehandelte Kontrollprobe bezogen, indem der Ct-Wert der behandelten Probe von dem Ct-Wert der Kontrollprobe abgezogen wird:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Kontrolle}} - Ct_{\text{Behandlung}}$$

Diese Berechnung der Expressionsunterschiede (Ratio) erfolgt ebenfalls für das Referenzgen. Beides wird unter Berücksichtigung der jeweiligen Effizienz in folgender Formel zusammengefasst:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta Ct_{\text{Zielgen(Kontrolle-Behandlung)}}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta Ct_{\text{Referenzgen(Kontrolle-Behandlung)}}}}$$

Die PCR-Effizienz wird am häufigsten mit einer Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen erstellt. Die dafür verwendete DNA (s. Generierung von DNA-Standards, S. 40f) stammt aus Zellen derselben Zelllinie wie die zu messenden Proben. Die eingesetzte

Menge an DNA wird in einer logarithmischen Funktion gegen die Ct-Werte aufgetragen. Die Effizienz lässt sich wie folgt berechnen:  $E = 10^{[-1/\text{Steigung}]}$ .

Die Realtime-PCR wurde in dieser Arbeit unter Verwendung des *QuantiFast™ SYBR® Green PCR-Kits* (Qiagen) mit Hilfe eines *LightCycler®* (Version 1.5, Roche) ausgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Alle Reagenzien sowie die cDNA-Templates aus der RT-PCR wurden in Polykarbonat-Kapillaren (Genaxxon) pipettiert, die zuvor in gekühlte Metallblockständer platziert wurden. Die Kapillaren wurden verschlossen und kurz zentrifugiert (230 x g, 1 min, RT). Anschließend wurden sie in das Reaktionsrondell des Cyclers überführt und die PCR-Reaktion gestartet.

<i>Reaktionsansatz für 20 µL:</i>	10	µL	2x QuantiFast™ SYBR® Green PCR Master Mix
	1	µL	f Primer (10 pmol/µL)
	1	µL	r Primer (10 pmol/µL)
	1	µL	cDNA
	7	µL	RNAse freies H <sub>2</sub> O

<i>Programm für Realtime-PCR:</i>	Preinkubation	95 °C	10 min	} 45 Zyklen
	Denaturierung	95 °C	15 s	
	Annealing	60 °C	15 s	
	Elongation	72 °C	20 s	
	Generierung der Schmelzkurven			
	Abkühlung	4 °C	∞	

Während der PCR-Reaktion wurden die Fluoreszenzintensitäten erfasst und mit Hilfe der *LightCycler®*-Software (Version 3.5, Roche) in einem angeschlossenen Computer dargestellt. Da der *Sybr®Green I*-Farbstoff unspezifisch an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle bindet, werden auch eventuell entstehende Primerdimere und nicht-spezifische PCR-Produkte erfasst. Das daraus resultierend Fluoreszenzsignal kann zu einer ungenauen Quantifizierung führen. Um solche Artefakte auszuschließen wurden nach Beendigung der PCR-Reaktion die Schmelzkurven der einzelnen Reaktionen analysiert. Zur Generierung einer Schmelzkurve wird die Temperatur im Cycler langsam erhöht. Bei niedrigen Temperaturen liegt die DNA als Doppelstrang vor, wodurch viel *Sybr®Green I*-Farbstoff binden kann. Steigt die Temperatur an, werden DNA-Moleküle denaturiert, was zu einer rapiden Abnahme der Fluoreszenz führt. Die Fluoreszenz wird dabei kontinuierlich aufgezeichnet und gegen die Temperatur aufgetragen. Der Peak einer Kurve liegt bei der Schmelztemperatur des Produkts ( $T_m$ ). Kurven, deren  $T_m$  niedriger sind als der des spezifischen PCR-Produkts weisen auf

Primer-Dimere hin. Zur Kontrolle der PCR-Qualität wurden die PCR-Produkte außerdem in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert (s. Agarose-Gele, unten).

### 2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren werden Agarose-Gele verwendet, wenn Moleküle mit einer Molekülgröße  $> 10$  nm analysiert werden sollen. Agarose ist ein Polysaccharid, das bei der Polymerisation ein großmaschiges Netz ausbildet.

In dieser Arbeit wurde zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Proben 1 %ige Agarose-Gele verwendet. Zur Herstellung wurde Agarose (Bioline) in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE, 1x) durch Erwärmung in der Mikrowelle gelöst und in einen abgedichteten Kunststoffschlitten gegossen und der Probekamm darin platziert. Nach vollkommener Auspolymerisierung wurde das Gel in die Elektrophorese-Vorrichtung gelegt und mit 1x TAE-Laufpuffer vollständig bedeckt.

*50x TAE-Puffer:*

0,5 M Tris  
5,7 % (v/v) Essigsäure  
0,05 M EDTA  
Ad A. dest  
Mit KOH auf pH 8,5 einstellen

*1x TAE-Puffer:*

2 % (v/v) 50x TAE  
Ad A. dest

Die Proben wurden mit 10x DNA-Ladepuffer gemischt und je 7  $\mu$ L des Proben-Ladepuffer-Gemischs in die Probentaschen geladen. Zur Größenbestimmung wurden neben den Proben 5  $\mu$ L DNA-Standard (*HyperladderI*, Bioline bzw. *100 bp DNA ladder*, NewEnglandBiolabs) geladen und im elektrischen Feld aufgetrennt.

*Standard-Programm für Agarose-Gelelektrophorese:*

Spannung (V)	Zeit (min)
100	45

<i>10x DNA-Ladepuffer:</i>	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	50 mM Tris pH 7,6
	60 % (v/v) Glycerin
	Ad A. dest
<i>100 bp DNA-Größenstandard für 6 µL:</i>	4     µL     A.dest
	1     µL     6x blauer Ladepuffer
	1     µL     DNA-Größenstandard

Zur Detektion der gelelektrophoretisch getrennten DNA-Proben wurde die Ethidiumbromid-Färbung eingesetzt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der sich zwischen die Basen von Nukleinsäuren einlagert.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel aus der Elektrophorese-Apparatur entnommen und 5 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (2,5 mg/L) gefärbt. Zur Entfernung von ungebundenem Farbstoff wurde es anschließend 5 min in 1x TAE-Puffer entfärbt. Das Gel wurde im durchscheinenden UV-Licht mit einem Dokumentationssystem (Image Master VDS, Pharmacia biotech) dokumentiert.

### 2.5.7 Generierung von DNA-Standards

Für die relative Quantifizierung in der RNA-Analytik werden DNA-Standards benötigt. Bei der Erstellung einer Standardreihe aus mindestens fünf Verdünnungsstufen ist zu beachten, dass die Menge der unbekannten Probe im mittleren Bereich dieser Kurve liegen sollte.

Zur Generierung der Standardkurve für jedes in dieser Arbeit nachzuweisende Gen wurde zunächst eine präparative RT-PCR (Durchführung wie Standard-RT-PCR, S. 58f) durchgeführt, um die aus unbehandelten Zellen isolierte mRNA in cDNA umzuschreiben. Dazu wurden 4 µg mRNA in einen 40 µL-PCR-Ansatz eingesetzt (präparativer Ansatz). 2 µg der entstandenen cDNA wurden in eine Standard-PCR (50 µL-Ansatz) überführt um die spezifischen DNA-Sequenzen von Ziel- bzw. Kontroll-Gen zu amplifizieren. Zur Kontrolle der PCR-Reaktion wurden 7 µL Probe in einem 1 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und dokumentiert (s. Agarose-Gelelektrophorese, S. 61f).

Um DNA-Standards hoher Qualität zu generieren, wurden die PCR-Produkte durch Gelextraktion aufgereinigt. Dadurch wird vermieden, dass Primer-Dimere die PCR-Reaktion der Realtime-PCR beeinträchtigen. Die Gelextraktion wurde mittels des *QIAquick*-Kits

(Qiagen) nach Herstellerangaben wie folgt durchgeführt: Der PCR-Ansatz wurde mit DNA-Ladepuffer versetzt und vollständig auf ein 1,5 %iges Agarose-Gel geladen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung und anschließender Dokumentation wurde das Gel auf einen UV-Durchlichttisch gelegt, um die DNA-Bande sichtbar zu machen. Mit einem Skalpell wurden sie aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß übertragen. Das Gelstück wurde in dem Reaktionsgefäß gewogen. Um das Agarose-Gel aufzulösen wurden 3 Volumen *QG*-Puffer zu 1 Volumen Gel pipettiert (z. B. 300 µL Puffer zu 100 mg Gel) und der Ansatz 10 min bei 50 °C inkubiert. Dann wurde 1 Gel-Volumen Isopropanol zu der Probe gegeben und vermischt. Die DNA-Probe wurde in eine *QIAquick*-Zentrifugensäule überführt und zentrifugiert (1 min, 17.900 x g, RT). Der Durchfluss wurde verworfen. Zur Entfernung von Agarosespuren wurde die Säule ein Mal mit 0,5 mL *GQ*-Puffer gewaschen. Um die gebundene DNA zu waschen wurde die Säule mit 0,75 mL *PE*-Puffer gewaschen und ein weiteres Mal zentrifugiert (1 min, 17.900 x g, RT). Nach Übertragung der Säule in ein frisches 1,5 mL-Reaktionsgefäß wurde die DNA durch Zugabe von 20-50 µl *EB*-Puffer eluiert (Zentrifugation: 1 min, 17.900 rpm, RT). Anschließend wurden die aufgereinigten DNA-Proben zur Reinheitskontrolle gelelektrophoretisch aufgetrennt und dokumentiert. Bis zur Weiterverwendung wurden sie bei – 20 °C aufbewahrt.

Die Primer für die Realtime-PCR wurden so ausgewählt, dass sie an DNA-Abschnitte des Gens innerhalb des aufgereinigten DNA-Fragments binden können. Diese Vorgehensweise entspricht der Methode der *Nested*-PCR. Sie beruht auf dem Prinzip, dass in einer ersten PCR-Reaktion Primer eingesetzt werden, durch die ein großes Fragment des Zielgens amplifiziert wird. In einer zweiten PCR-Reaktion werden Primer eingesetzt, die so gewählt werden, dass sie komplementär an weiter innen liegende Nukleotidsequenzen des gleichen Gens binden, wodurch ein kürzeres DNA-Fragment des Zielgens amplifiziert wird. Damit wurde die Anlagerung der Primer an das DNA-Template in der Realtime-PCR verbessert. Sobald das aufgereinigte PCR-Produkt vorlag, wurden daraus mehrere Verdünnungsstufen in Duplikaten mit RNase freiem Wasser angesetzt. Eine Realtime-PCR wurde mit diesen Proben durchgeführt und aus den erhaltenen Ct-Werten eine Standardgerade erstellt (s. relative Quantifizierung der mRNA, S. 59ff).



### **3. Statistische Auswertung**

Für die statistischen Auswertungen wurde die *GraphPad Prism*-Software (Version 4) benutzt. Unterschiede zwischen stetigen Merkmalen wurden bei dem Vergleich von zwei Gruppen mittels T-Test, bei mehr als zwei Gruppen mit ANOVA analysiert. Ein p-Wert  $< 0,05$  (95 % Unterschied/Zusammenhang) wurde als signifikant erachtet.

## VII Ergebnisse

Der B-Zell-aktivierende Faktor BAFF ist seit seiner Entdeckung 1999 immer mehr in den Interessenfokus von Autoimmunologen gerückt. Dieses, hauptsächlich von Monozyten produzierte, Zytokin wird mittlerweile als Schlüsselfigur bei Überleben, Differenzierung und Antikörperproduktion der B-Zellen beschrieben (Batten et al. 2000; Mackay und Browning 2002; Mackay et al. 2003). Gestützt werden diese Formulierungen von zwei Beobachtungen. Zum einen führt die Dysregulation von BAFF im Mausmodell zu starken Defiziten in der B-Zell-Entwicklung und der Immunabwehr, die in der Ausbildung von autoimmunologischen Krankheitsbildern wie beim Menschen resultieren (Mackay et al. 1999; Khare et al. 2000; Groom et al. 2002). Zum anderen wurde für eine Reihe von Erkrankungen, wie Systemischer Lupus erythematodes (SLE), Sjögrens Syndrom (SS) und Rheumatoide Arthritis (RA), ein erheblicher Anstieg des BAFF-Levels im Serum der Patienten nachgewiesen (Cheema et al. 2001; Zhang et al. 2001; Groom et al. 2002; Mackay et al. 2005). Der Mechanismus, der einer Dysregulation zu Grunde liegt, ist bisher allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

Viele der autoimmunologischen Erkrankungen, für die erhöhte BAFF-Serumspiegel beschrieben wurden, sind vor allem durch B-Zell-vermittelte Fehlfunktionen charakterisiert. Seit Jahrzehnten werden betroffene Patienten mit Intravenösem Immunglobulin (IVIg) oder Corticosteroiden therapiert. Beide Behandlungen sind sehr effektiv in der Verminderung des Schweregrades der Erkrankungen und verringern das Leiden der Patienten. Wie diese Präparate im Detail wirken ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Für IVIg wird unter anderem eine Modulation des Komplementsystems und die Neutralisierung von Autoantikörpern diskutiert (Dalakas 1999; Kazatchkine und Kaveri 2001). Für Corticosteroide wurden unter anderem die Induktion von Apoptose in B- und T-Zellen (Tuckermann et al. 2005) sowie ein Einfluss auf die Expression verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Gene in Makrophagen (Ehrchen et al. 2007) als immunsuppressive Wirkmechanismen postuliert.

Basierend auf diesem Informationshintergrund ergab sich die Frage ob Präparate der beiden Hauptwirkstoffgruppen, Immunglobuline und Corticosteroide, einen Einfluss auf die BAFF-Expression in Monozyten haben und ob darüber eine Erklärung für die Behandlungserfolge geliefert werden kann. Im Falle eines nachweisbaren Einflusses wäre es weiterhin zu klären, ob beide Wirkstoffe über unterschiedliche Wirkmechanismen Einfluss auf BAFF nehmen,

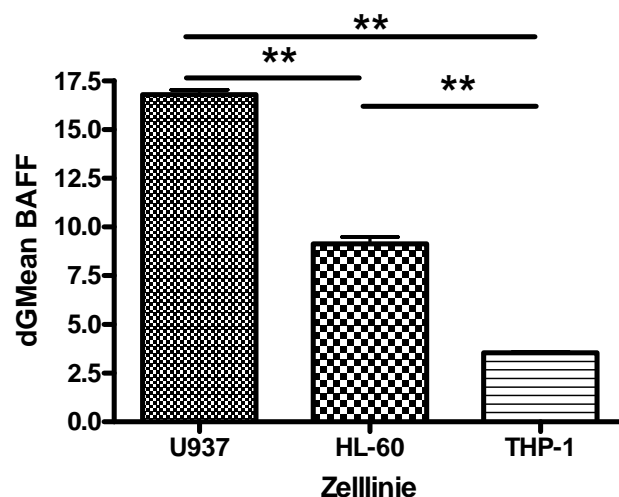
oder ob es einen gemeinsamen Nenner gibt. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwerte aus Triplikaten einzelner Versuche dargestellt, welche jeweils in zwei weiteren unabhängigen Versuchen reproduziert wurden.

## **1. Untersuchung der basalen Expression und Sekretion von BAFF in den Zelllinien U937, HL-60 und THP-1**

### **1.1 Membranständiges BAFF**

Zunächst wurden drei humane monozytäre Zelllinien, U937, HL-60 und THP-1, nach 72stündiger Kultivierung auf ihre basale BAFF-Expression hin untersucht. Zum Nachweis der membrangebundenen Expression von BAFF und CD14 wurden die Zellen nach Standardprotokoll für die durchflusszytometrische Analyse aufgearbeitet (s. Methoden S. 37f). Mittels Durchflusszytometrie wurden die geometrisch-gemittelten Fluoreszenzintensitäten (GMean) von 10.000 Ereignissen pro Proben gemessen und der dGMean berechnet.

In allen getesteten Zelllinien monozytären Ursprungs konnte eine Expression des membrangebundenen BAFF nachgewiesen werden. Die monozytäre Zelllinie U937 zeigte dabei die höchste Expression (dGMean:  $16,8 \pm 0,2$ ). HL-60-Zellen zeigten eine geringere (dGMean:  $9,13 \pm 0,4$ ) und THP-1-Zellen die geringste BAFF-Expression (dGMean:  $3,54 \pm 0,1$ ; Abb. 7).



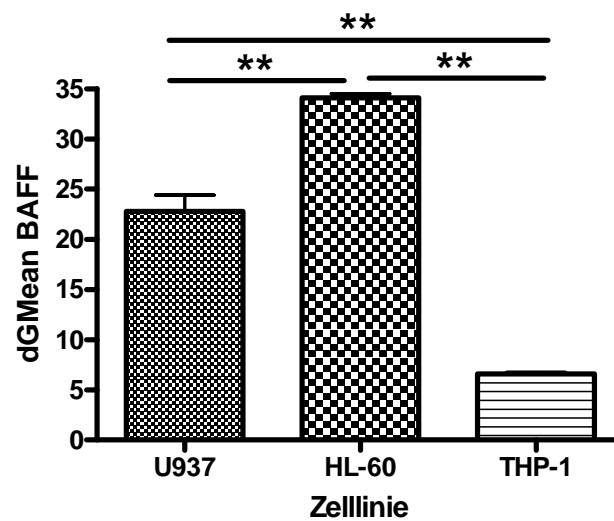
**Abb. 7: Basale Expression von membranständigem BAFF in verschiedenen monozytären Zelllinien.**

In U937-, HL-60- und THP-1-Zellen wurden nach 72 h Inkubation die basale Expression des membranständigen BAFF durchflusszytometrisch gemessen ( $n = 3$ ). Die höchste Expression wurde in U937-Zellen detektiert, gefolgt von HL-60 und THP-1. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken dargestellt. \*\* =  $p < 0,001$

## 1.2 Intrazelluläres BAFF

Für die Messung der intrazellulären Expression von BAFF und CD14 wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, bevor sie mit den Antikörpern bzw. Isotypen inkubiert wurden.

In allen untersuchten monozytären Zelllinien war eine Expression des intrazellulären BAFF detektierbar. HL-60-Zellen zeigten die höchste Expression (dGMean:  $34,1 \pm 0,7$ ), gefolgt von U937-Zellen (dGMean:  $22,80 \pm 1,6$ ) und THP-1 Zellen (dGMean:  $6,57 \pm 0,3$ ; Abb. 8).



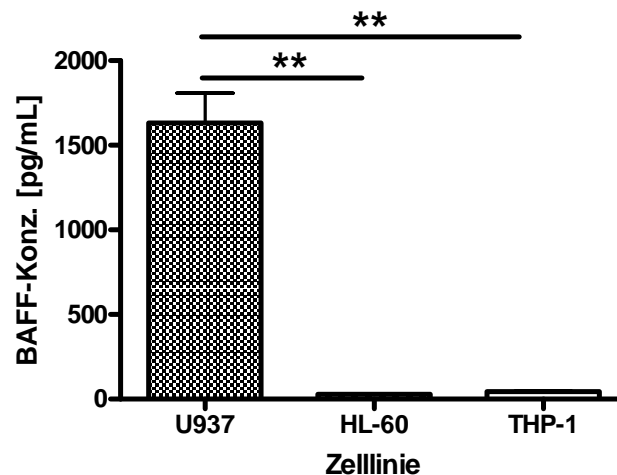
**Abb. 8: Basale Expression von intrazellulärem BAFF in verschiedenen monozytären Zelllinien.**

Die basale Expression von intrazellulären BAFF wurde in den Zelllinien U937, HL-60 und THP-1 nach einer 72 stündigen Inkubation durchflusszytometrisch gemessen (n = 3). In HL-60-Zellen wurde die höchste intrazelluläre BAFF-Expression detektiert, in THP-1 die Niedrigste. Die kleinen Balken zeigen die Standardabweichung (SD) an. \*\* =  $p < 0,001$

### 1.3 Sekretion von BAFF

Da von BAFF neben der membrangebundenen auch eine lösliche Form existiert, wurde die Konzentration des sekretierten, löslichen BAFF in den Zellkulturüberständen mit einem ELISA gemessen.

In allen Überständen konnte lösliches BAFF nachgewiesen werden. In den Überständen der Zelllinie U937 wurden die höchsten BAFF-Konzentrationen detektiert (BAFF-Konz. [pg/mL]:  $1632 \pm 177,6$ ). In den Überständen der HL-60- sowie der THP-1-Zellen waren die Konzentrationen des freigesetzten BAFF signifikant niedriger (BAFF-Konz. [pg/mL]: HL-60:  $28,11 \pm 0$ , THP,1:  $44,51 \pm 4,52$ ; Abb. 9).



**Abb. 9: Basale Freisetzung von löslichem BAFF in monozytären Zelllinien.**

Die Konzentration von löslichem BAFF in den Kulturüberständen von U937-, HL-60- und THP-1-Zellen wurde nach 72 h Inkubation mit Hilfe eines BAFF-ELISAs ermittelt (n = 3). Die BAFF-Freisetzung von U937-Zellen ist deutlich höher als die der HL-60- und der THP-1-Zellen. Die kleinen Balken zeigen die Standardabweichung (SD) an. \*\* = p < 0,001

Zusammenfassend haben diese Versuche gezeigt, dass die monozytäre Zelllinie U937 auf Ebene des membranständigen BAFF und dessen Freisetzung die höchste Produktion des Zytokins aufweisen, verglichen mit den anderen beiden untersuchten Zelllinien. Auch wenn HL-60-Zellen intrazellulär signifikant mehr BAFF exprimieren wurde die Zelllinie U937 als Modell für weitere Expressions- und Sekretionsstudien gewählt.

## 2. Wirkung des Immunmodulators *Gamunex*® auf die Expression und Freisetzung von BAFF in Monozyten

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der Effekte von IVIg auf die Expression und Freisetzung des B-Zell-aktivierenden Faktors BAFF das Immunglobulinpräparat *Gamunex*® (Talecris) als Stellvertreter dieser Wirkstoffgruppe verwendet. (Falls nicht anderweitig erwähnt wird *Gamunex*® im Folgenden der Einfachheit halber als „IVIg“ bezeichnet). Ziel dieser Untersuchungen war es eine mögliche Erklärung für die erfolgreiche Behandlung von vor allem B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen zu erhalten.

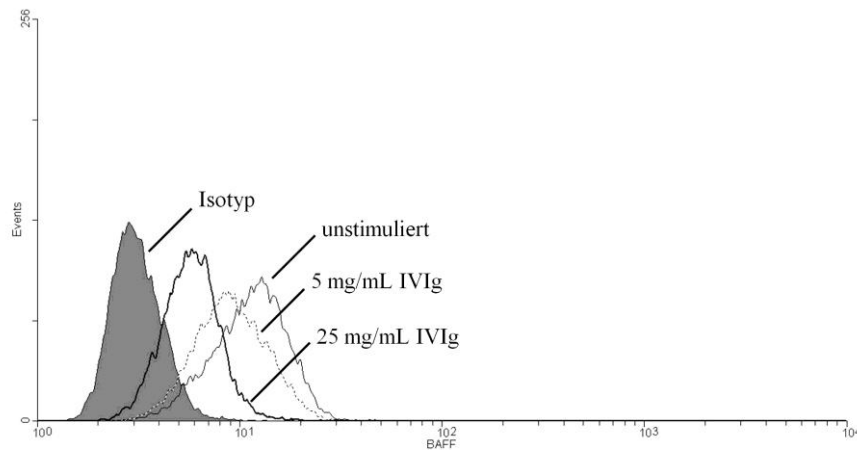
## **2.1 Die Effekte von IVIg**

### **2.1.1 IVIg reguliert die Expression von membrangebundenem BAFF in Monozyten herunter**

Aufgrund ihrer hohen konstitutiven BAFF-Expression wurde die Zelllinie U937 als Modell für die Expressionsuntersuchungen gewählt, und mit zwei unterschiedlichen IVIg-Konzentrationen (5 und 25 mg/mL) für 24, 48 und 72 h stimuliert. Die eingesetzten IVIg-Konzentrationen entsprechen den physiologischen Serumkonzentrationen von Patienten, die 0,4 g/kg KG bzw. 2 g/kg KG des Präparats verabreicht bekommen.

Nach der Stimulation wurden die Zellen geerntet und für die durchflusszytometrische Messung der membrangebundenen BAFF-Expression aufgearbeitet. Die verwendeten Antikörper sowie die Versuchsdurchführung entsprachen den Versuchen zur Bestimmung der basalen Expression von BAFF.

In dem beispielhaft dargestellten Histogramm einer durchflusszytometrischen Messung nach 72 h Stimulation sind die Kurven einer Probe von unstimulierten und mit 5 bzw. 25 mg/mL IVIg stimulierten Zellen gezeigt (Abb. 10). Die Kurve der Isotypkontrolle lag zwischen einer Fluoreszenzintensität von  $10^0$  bis  $10^1$  und ist somit negativ. Die Kurven der Proben, in denen sich der anti-BAFF-Antikörper befand, lagen rechts von der Kurve des Isotyps. Bei dem Vergleich der Kurven der behandelten Zellen, zeigte sich eine Linksverschiebung der Kurven mit steigender IVIg-Konzentration. Diese Linksverschiebung zeigt die konzentrationsabhängige Abnahme der Expression des membranständigen BAFF in U937-Zellen nach einer 72stündigen Inkubation mit IVIg.

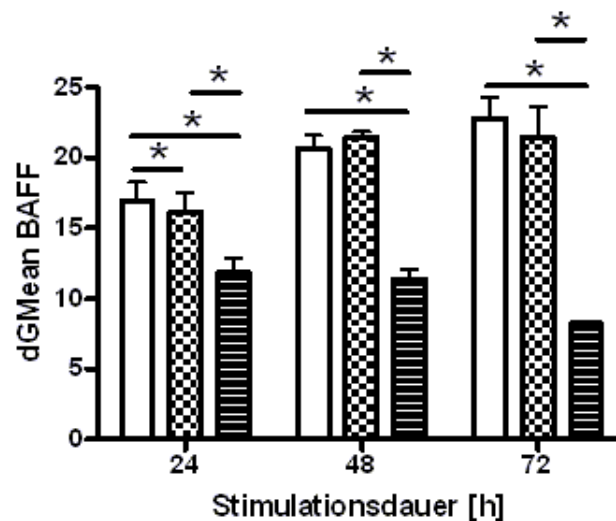


**Abb. 10: Herunterregulierung der BAFF-Expression in Monozyten.**

Zellen der Linie U937 wurden für 72 h mit 5 mg/mL und 25 mg/mL IVIg stimuliert. Die Referenzzellen (= unstimuliert) wurden mit 1x PBS inkubiert. Nach der Stimulation wurde die Oberflächenexpression von BAFF im Durchflusszytometer detektiert. Die Isotypkontrolle ist negativ. Die Linksverschiebung der Kurven durch die Zugabe von IVIg zu den Zellen entspricht einer konzentrationsabhängigen Abnahme der BAFF-Expression.

Die BAFF-Expression auf der Zelloberfläche wurde durch Stimulation mit IVIg herunter reguliert. Dieser Effekt lässt sich bereits nach 24 h detektieren. Am deutlichsten ist er nach 72 h (Abb. 11). Nach 24 h nahm die membrangebundene Expression von BAFF durch die Zugabe von 5 und 25 mg/mL IVIg konzentrationsabhängig ab (dGMean, unstimuliert:  $16,98 \pm 1,3$ ; 5 mg/mL IVIg:  $16,15 \pm 1,34$ ; 25 mg/mL IVIg:  $11,83 \pm 0,99$ ). Nach 48 h und 72 h war die Abnahme der Expression von membrangebundenen BAFF stärker als nach 24 h (dGMean, 48 h unstimuliert:  $20,7 \pm 1,2$ ; 5 mg/mL IVIg:  $21,45 \pm 0,4$ ; 25 mg/ml IVIg:  $11,38 \pm 0,6$ ; 72 h unstimuliert:  $22,83 \pm 1,5$ ; 5 mg/mL IVIg:  $21,44 \pm 2,2$ ; 25 mg/ml IVIg:  $8,2 \pm 0,1$ ). Die in Abb.11 dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte von Duplikaten aus einem Versuch. Sie wurden in zwei weiteren unabhängigen Versuchen reproduziert.



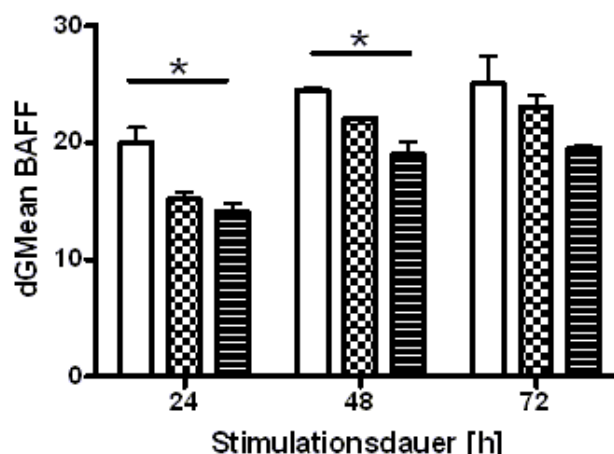


**Abb. 11: Herunterregulierung der membranständigen BAFF-Expression durch IVIg in Monozyten.**

U937-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit zwei Konzentrationen von IVIg, 5 (kariert) und 25 mg/mL (liniert), stimuliert. Nach der Ernte wurde die Expression des membrangebundenen BAFF der Zellen im Durchflusszytometer detektiert (n = 2). Die Abnahme der Expression durch IVIg war konzentrationsabhängig und signifikant im Vergleich zu unstimulierten Zellen (weiß). Der stärkste Effekt war nach 72 h zu detektieren. Die kleinen Balken zeigen die Standardabweichung (SD) an. \* =  $p < 0,05$  bzw. 0,01

### 2.1.2 IVIg reguliert die Expression von intrazellulärem BAFF in Monozyten herunter

Nach Detektion einer Verringerung der BAFF-Expression durch IVIg auf der Oberfläche von U937-Zellen wurde dessen Effekt auf die Expression von BAFF im Zytoplasma untersucht. Inkubationen der U937-Zellen, wie unter 2.1.2 beschrieben, ließen auf Ebene der intrazellulären BAFF-Expression eine konzentrationsabhängige Herabsetzung beobachten (dGMean: 24 h: Ø:  $20,03 \pm 1,3$ ; 5 mg/mL IVIg:  $15,20 \pm 0,6$ ; 25 mg/mL IVIg:  $14,15 \pm 0,7$ ; 48 h: unstimuliert:  $24,47 \pm 0,2$ ; 5 mg/mL IVIg:  $22,1 \pm 0,0$ ; 25 mg/ml IVIg:  $19 \pm 1,2$ ; 72 h: unstimuliert:  $25,1 \pm 2,4$ ; 5 mg/mL IVIg:  $23 \pm 1,0$ ; 25 mg/ml IVIg:  $19,55 \pm 0,2$ ; Abb. 12). Die in Abb. 12 dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte von Duplikaten aus einem Versuch. Sie wurden in zwei weiteren unabhängigen Versuchen reproduziert.

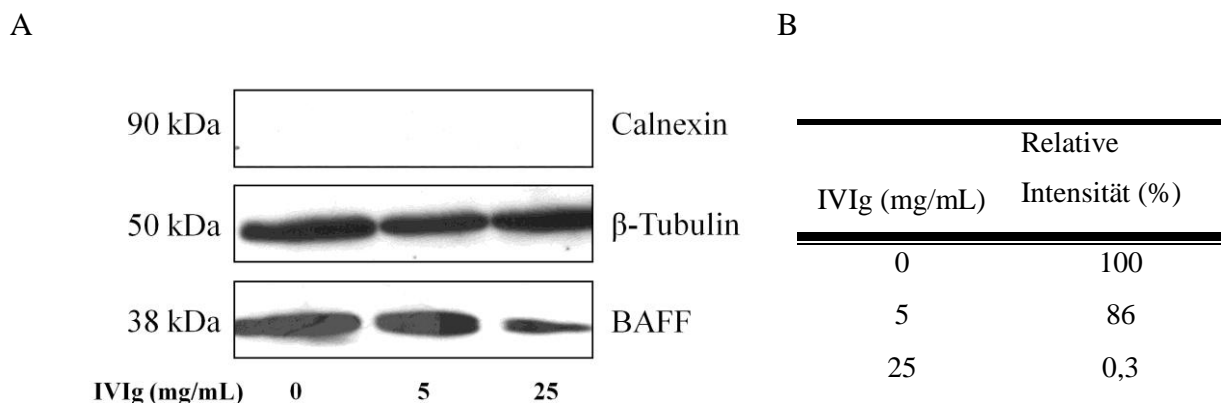


**Abb. 12: Herabsetzung der intrazellulären BAFF-Expression in U937-Zellen nach Stimulation mit IVIg.**

U937-Zellen wurden für 24, 48, und 72 h mit verschiedenen IVIg-Konzentrationen (5 (kariert) und 25 mg/mL (liniert)) stimuliert (n = 2). Anschließend wurde die intrazelluläre Expression von BAFF mittels Durchflusszytometer analysiert. Verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß) nimmt die Expression von intrazellulärem BAFF durch IVIg konzentrationsabhängig ab. Die kleinen Balken stellen die Standardabweichung (SD) dar. \* = p < 0,05

Da bei der Messung intrazellulärer Antigene im FACS eine gleichzeitige Markierung der Oberflächenantigene stattfindet, wurden zusätzlich Western Blot-Analysen der zytoplasmatischen Proteinfraction durchgeführt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und BAFF mit einem spezifischen Antikörper (0,6 µg/mL, Kaninchen anti human; AbD Serotec) und einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (Ziege anti Hase) durch Chemilumineszenz nachgewiesen. Als Referenzprotein für die zytoplasmatische Fraktion wurde  $\beta$ -Tubulin gewählt. Der Nachweis von Calnexin diente als Reinheitsnachweis der Fraktion, da Calnexin als membranständiges Protein im Zytoplasma nur im Falle einer Kontamination nachzuweisen ist.

Die Auswertung der Filme ergab eine konzentrationsabhängige Abnahme der zytoplasmatischen BAFF-Expression nach 72 h Inkubation mit IVIg (Abb. 13 A). Die Auswertung der relativen Intensitäten zeigte eine signifikante Verringerung der BAFF-Expression durch IVIg im Vergleich zu unstimulierten Zellen (unstimuliert: 100 %; 5 mg/mL: 86 %; 25 mg/mL: 0,3 %; Abb. 13 B). Dieses Ergebnis wurde in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert.



**Abb. 13: Western Blot-Analyse der zytoplasmatischen Fraktion von U937-Zellen.**

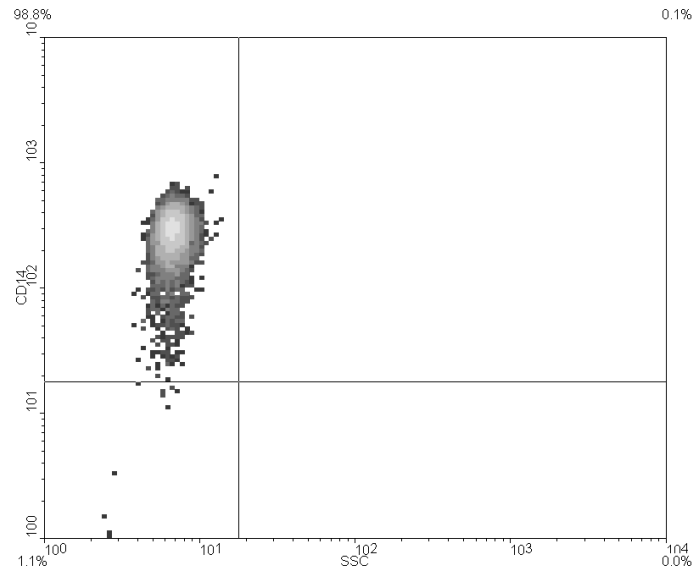
U937-Zellen wurden für 72 h mit 5 und 25 mg/mL IVIg stimuliert. Anschließend wurde die zytoplasmatische Proteinfraction der Zellen isoliert und mit SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels Western Blot-Analyse wurde BAFF als Zielprotein und  $\beta$ -Tubulin als Referenzprotein nachgewiesen. Der Nachweis von Calnexin diente als Reinheitskontrolle der Proben. Die Expression des zytoplasmatischen BAFF nahm durch die Inkubation mit IVIg konzentrationsabhängig ab. Dargestellt sind (A) exemplarisch ein Film der Membran und (B) die relativen Intensitätsunterschiede der verschiedenen Proben.

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse wurden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung für die Herunterregulierung des intrazellulären BAFF durch IVIg bestätigt.

## 2.2 IVIg reguliert die Expression von membrangebundenem BAFF in primären Monozyten herunter

Durch die Immortalisierung von Zellen können Eigenschaften dieser Zellen verloren gehen oder verändert werden. Um zu zeigen, dass die anhand von U937-Zellen erhaltenen Ergebnisse von physiologischer Relevanz sind, wurden primäre Monozytenkulturen (Gewinnung und Durchführung s. Methoden S. 33f) angelegt. Monozyten wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert und die Reinheit der erhaltenen Population durchflusszytometrisch überprüft. Dazu wurde ein Aliquot der Zellen für den Nachweis von Oberflächenantigenen aufgearbeitet und im FACS analysiert. Als Oberflächenmarker für die Diskriminierung von Monozyten diente CD14, ein Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS), der konstitutiv nur auf Monozyten exprimiert wird. 10.000 Ereignisse wurden pro Probe aufgezeichnet. In Abb. 14 ist das Ergebnis einer Messung beispielhaft in Form eines Dichte-Diagramms (*density plot*) dargestellt. Die Reinheit des Isolates lag bei > 98 %. Die

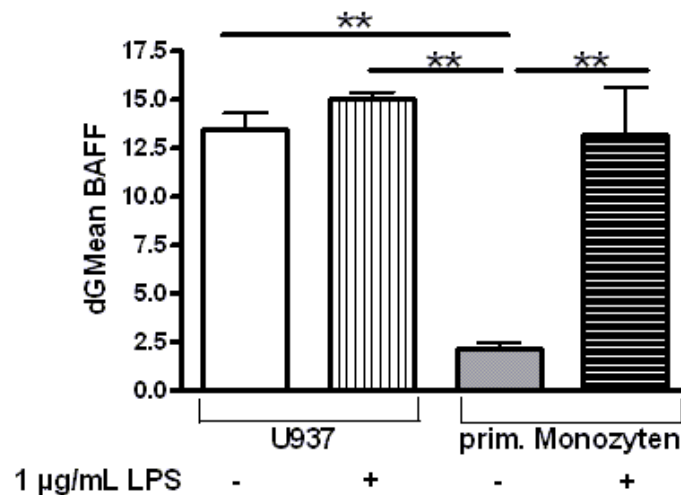
Überprüfung der Reinheit wurde mehrfach durchgeführt, nach dem Monozyten aus unterschiedlichen Spendern isoliert wurden.



**Abb. 14: Überprüfung der Reinheit der primär isolierten Monozyten.**

Ein Aliquot der Zellen wurde direkt nach der Isolierung aus periphärem, humanem Blut mit einem anti-CD14-Antikörper inkubiert, um zu überprüfen wie hoch die Monozytenreinheit des Isolats ist. Die 10.000 erfassten Ereignisse sind als Dichte-Diagramm dargestellt. Die Reinheit beträgt 98,8 %.

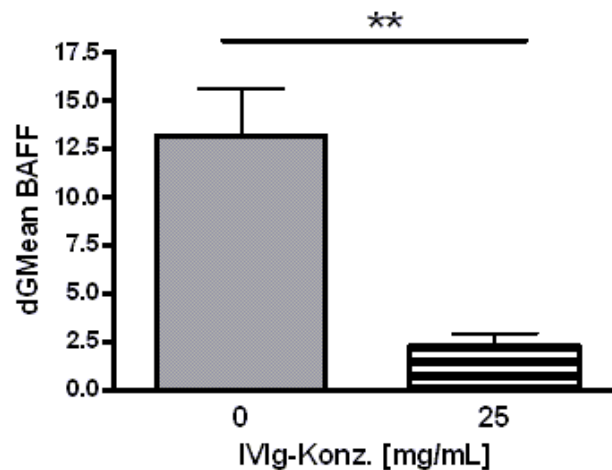
Anschließend wurden die primär isolierten Monozyten für die Dauer einer 72stündigen Stimulation in Kultur genommen. Die Expression von membranständigem BAFF wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Da die basale Expression des oberflächengebundenen BAFF in primären Monozyten im Vergleich zu U937-Zellen sehr gering war (dGMean, U937:  $12,09 \pm 0,9$ ; prim. Monozyten:  $2,09 \pm 0,4$ ) wurden die Primärkulturen mit  $1 \mu\text{g/mL}$  Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert (dGMean, prim. Monozyten:  $13,14 \pm 2,5$ ; Abb. 15). Eine LPS-Stimulation von U937-Zellen zeigt keinen Einfluss auf die Expression von BAFF.



**Abb. 15: Vergleich der basalen und der LPS-stimulierten Oberflächenexpression von BAFF auf U937-Zellen und primären Monozyten.**

Die Zellen der immortalisierten Zelllinie U937 und der primären Monozyten wurden mit 1x PBS und 1 µg/mL LPS für 72 h kultiviert. Anschließend wurde die Oberflächenexpression von BAFF mittels FACS analysiert (n = 3). Die basale Expression auf der Oberfläche von U937-Zellen (weiß) war signifikant höher als die auf primäre Monozyten (grau). Allerdings konnte die basale Expression in primären Monozyten durch Zugabe von 1 µg/mL LPS (quer gestreift) signifikant erhöht werden, wohingegen sie bei U937-Zellen keinen Effekt zeigte (längs gestreift). Die dünnen Balken geben die Standardabweichung (SD) an. \*\* = p < 0,001

Die BAFF-Expression in primären Monozyten wurde durch Zugabe von LPS (1 µg/mL) aktiviert und anschließend mit 25 mg/mL IVIg für 72 h stimuliert. Auf der Ebene des membrangebundenen BAFF konnte eine Abnahme durch IVIg mittels FACS in primären Monozyten nachgewiesen werden (dGMean, unstimuliert: 13,14 ± 2,5; 25 mg/mL IVIg: 2,3 ± 0,6; Abb. 16).



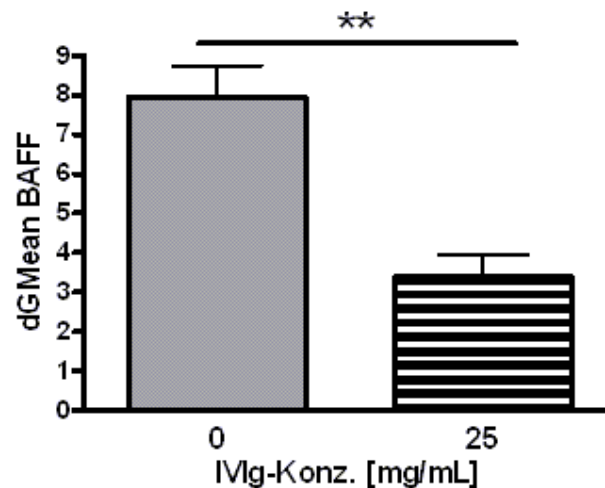
**Abb. 16: Herabsetzung der membranständigen BAFF-Expression in primären Monozyten durch IVIg.**

Die prim. Monozyten wurden mit 1 µg/mL LPS aktiviert (grau) und mit 25 mg/mL IVIg stimuliert (gestreift; n = 3) für 72 h stimuliert. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression des membrangebundenen BAFF gemessen. IVIg führte zu einer signifikanten Abnahme der BAFF-Expression. Die dünnen Balken geben die Standardabweichung (SD) an. \*\* = p < 0,005

### 2.2.1 IVIg reguliert die Expression von intrazellulärem BAFF in primären Monozyten herunter

Um den Effekt von IVIg auf die intrazelluläre Expression von BAFF in primären Monozyten zu untersuchen, wurden diese mit LPS (1 µg/mL) aktiviert und für 72 h mit IVIg (25 mg/mL) stimuliert.

Auf Ebene der intrazelluläre BAFF-Expression war in primär isolierten Monozyten ebenfalls eine signifikante Abnahme durch IVIg nach 72 h nachweisbar (dGMean, unstimuliert:  $7,96 \pm 0,8$ ; 25 mg/mL IVIg:  $3,4 \pm 0,5$ , Abb. 17).



**Abb. 17: Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression in primärisolierten Monozyten durch IVIg.**

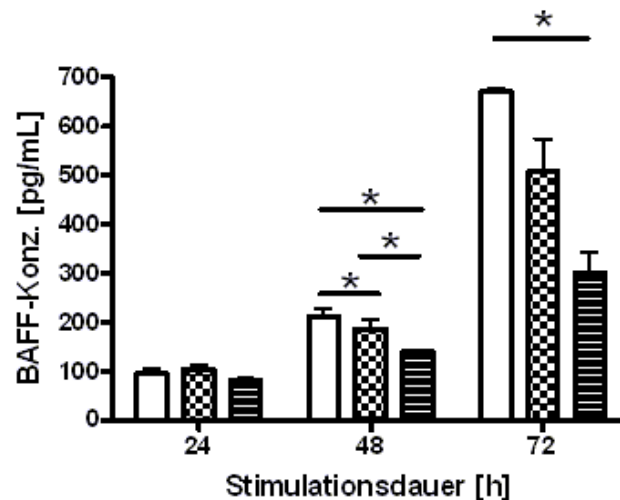
Die prim. Monozyten wurden für 72 h mit 1 µg/mL LPS aktiviert (grau) und mit 25 mg/mL IVIg stimuliert (gestreift) stimuliert (n = 3). Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression des intrazellulären BAFF gemessen. IVIg führte zu einer signifikanten Abnahme der BAFF-Expression. Die dünnen Balken geben die Standardabweichung (SD) an. \*\* = p < 0,005

Zusammenfassend konnte mit diesen Resultaten gezeigt werden, dass hochdosiertes IVIg (25 mg/mL) in primär isolierten, LPS-aktivierten Monozyten einen vergleichbaren herunter regulierenden Effekt auf die Expression des membranständigen und intrazellulären BAFF hat, wie in dem Model U937.

### 2.2.2 IVIg resultiert in einer Abnahme der BAFF-Freisetzung in Monozyten

Die Sekretion von BAFF in Überständen von U937-Kulturen, die für 24, 48 und 72 h mit zwei IVIg-Konzentrationen (5 und 25 mg/mL) stimuliert worden waren, wurde mittels ELISA untersucht.

Zu allen Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme von BAFF durch IVIg detektiert werden (Abb. 18). Nach 24 h Inkubation mit IVIg war diese Tendenz bereits zu beobachten (BAFF-Konz. [pg/mL], unstimuliert:  $94,74 \pm 11,0$ ; 5 mg/mL IVIg:  $104,26 \pm 10,3$ ; 25 mg/mL IVIg:  $82,05 \pm 4,5$ ). Die deutlichste Abnahme des löslichen BAFF wurde in Überständen von 72 h-Kulturen detektiert (BAFF-Konz. [pg/mL], unstimuliert:  $671,37 \pm 4,5$ ; 5 mg/mL IVIg:  $506,36 \pm 68,6$ ; 25 mg/mL IVIg:  $300,55 \pm 43,0$ ).



**Abb. 18: Verringerung der BAFF-Freisetzung in Monozyten durch IVIg.**

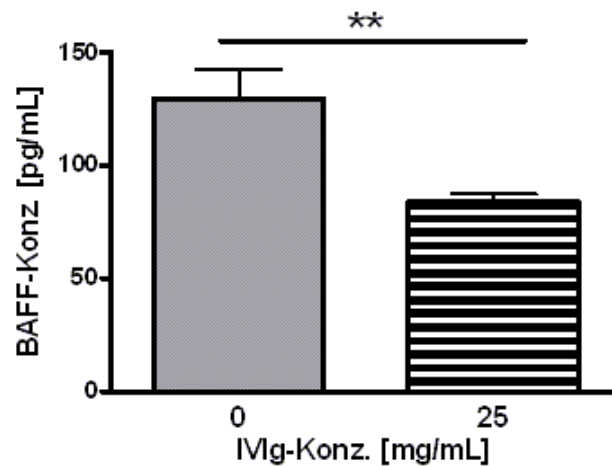
U937-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit zwei verschiedenen IVIg-Konzentrationen (5 und 25 mg/mL) stimuliert und anschließend die Konzentration des löslichen BAFF in den Kulturüberständen mittels ELISA gemessen ( $n = 2$ ). Im Vergleich zu unstimulierten Zellen (weiß) nahm die Konzentration des löslichen BAFF nach Stimulation mit 5 (kariert) und 25 mg/mL (liniert) IVIg ab. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig und nach 48 bzw. 72 h signifikant. Die dünnen Balken geben die Standardabweichung (SD) an. \* =  $p < 0,05$

### 2.2.3 IVIg verringert die BAFF-Freisetzung in primären Monozyten

Nachdem eine signifikante Reduktion der Konzentration an löslichem BAFF in den Kulturüberständen von U937-Zellen durch IVIg gezeigt werden konnte, wurde die Freisetzung in primärisolierten Monozyten untersucht. Die Messung des freigesetzten, löslichen BAFF in Kulturüberständen von primär isolierten Monozyten nach 72stündiger Inkubation mit 25 mg/mL IVIg wurde mittels ELISA durchgeführt.

Die Freisetzung von BAFF in den Kulturüberstand der primärisolierten Monozyten nahm durch IVIg ab (BAFF-Konz. [pg/mL], unstimuliert:  $129,4 \pm 13,2$ ; 25 mg/mL IVIg:  $83,91 \pm 3,7$ ; Abb. 19).





**Abb. 19: Verringerung der BAFF-Freisetzung in primären Monozyten durch IVIg.**

Prim. Monozyten wurden für 72 h mit LPS (1 µg/mL) aktiviert (grau) und mit 25 mg/mL IVIg stimuliert (gestreift; n = 3). Bei der anschließenden Untersuchung der Kulturüberstände wurde eine signifikante Abnahme des sezernierten BAFF detektiert. Die dünnen Balken geben die Standardabweichung (SD) an. \*\* = p < 0,005

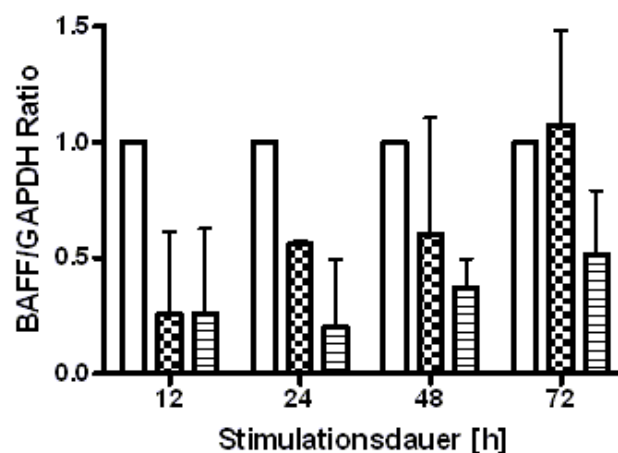
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die BAFF-Expression auf allen drei untersuchten Proteinebenen, membrangebunden, intrazellulär und Freisetzung, in U937-Zellen signifikant und konzentrationsabhängig durch IVIg herunter reguliert wird. Diese Ergebnisse wurden in primärisolierten Monozyten mit hochdosiertem IVIg (25 mg/mL) bestätigt werden. Die Durchführung aller weiteren Untersuchungen erfolgte daher ausschließlich in dem U937-Model durchgeführt.

#### 2.2.4 IVIg führt zu einer Herunterregulierung der BAFF-mRNA in Monozyten

Die BAFF-Expression auf mRNA-Ebene wurde untersucht um zu ermitteln, ob der Expressionsabnahme auf Proteinebene eine transkriptionale oder eine post-transkriptionale Regulierung zugrunde liegt.

Nach der Stimulation von U937-Zellen für 12, 24, 48 und 72 h wurde die mRNA aus den Zellen isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese wurde in die quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt und die BAFF/GAPDH Ratio für jede Probe ermittelt. Daraus konnten mittels relativer Quantifizierung die Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen auf mRNA-Ebene analysiert werden. Nach 12, 24 h und 48 h wurde die BAFF-mRNA durch IVIg konzentrationsabhängig reduziert (BAFF/GAPDH Ratio: 12 h, unstimuliert:  $1 \pm 0$ ; 5 mg/mL IVIg:  $0,26 \pm 0,36$ ; 25 mg/mL IVIg:  $0,26 \pm 0,37$ ; 24 h,

unstimuliert:  $1 \pm 0$ ; 5 mg/mL IVIg:  $0,56 \pm 0,01$ ; 25 mg/mL:  $0,21 \pm 0,29$ ; 48 h: unstimuliert:  $1 \pm 0$ ; 5 mg/mL IVIg:  $0,61 \pm 0,5$ ; 25 mg/mL IVIg:  $0,37 \pm 0,13$ ; Abb. 20). Nach 72 h war der Effekte der geringeren BAFF-Konzentration (5 mg/mL) kaum noch zu detektieren. 25 mg/mL IVIg resultierten wie bei den kürzeren Stimulationszeiträumen in einer starken Reduktion der BAFF-mRNA (BAFF/GAPDH Ratio: 72 h unstimuliert:  $1 \pm 0$ ; 5 mg/mL IVIg:  $1,075 \pm 0,4$ ; 25 mg/mL IVIg:  $0,52 \pm 0,28$ ; Abb. 20). Die in Abb. 20 dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus Duplikaten eines einzelnen Versuchs. Sie wurden in einem weiteren Versuch bestätigt.



**Abb. 20: Bestimmung der relativen BAFF-mRNA-Menge.**

U937-Zellen wurden für 12, 24, 48 und 72 h mit IVIg (5 und 25 mg/mL) stimuliert ( $n = 2$ ). Anschließend wurde die mRNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde als Template in die quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt. Mittels relativer Quantifizierung wurde die BAFF/GAPDH Ratio ermittelt. Verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß) wurde die BAFF/GAPDH Ratio mit IVIg (5 mg/mL (kariert), 25 mg/mL (gestreift)) reduziert. Die dünnen Balken geben die Standardabweichung (SD) an.  $p > 0,05$

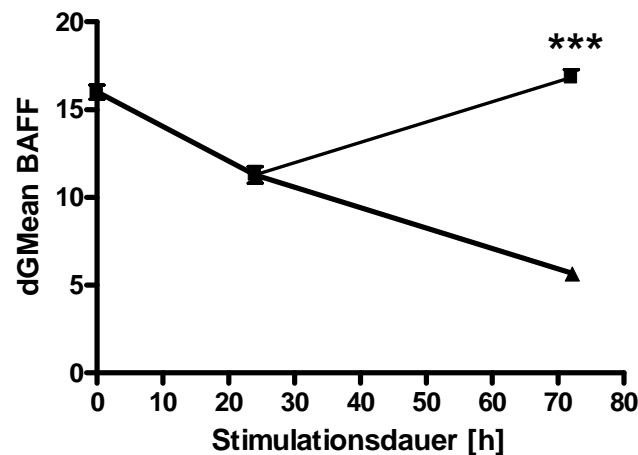
Mit dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass IVIg BAFF auch auf der mRNA-Ebene herunter reguliert.

## 2.3 Reversibilität der Effekte von IVIg

### 2.3.1 Der Effekt von IVIg auf die membrangebundene BAFF-Expression in Monozyten ist reversibel

Immunglobuline haben eine Halbwertszeit von ca. 18-32 Tagen, allerdings nimmt die Konzentration des injizierten IVIg im Serum bereits in den ersten 3 Tagen um 50 % ab (Dalakas 2002). Aus diesen Gründen war der nächste Schritt herauszufinden ob die ständige Anwesenheit von IVIg notwendig für dessen *in vitro*-Wirksamkeit ist.

Dazu wurden U937-Zellen für 24 h mit 25 mg/mL IVIg stimuliert und anschließend ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden für weitere 48 h in Medium ohne IVIg kultiviert. Die Kontrollgruppe bekam nach dem Mediumwechsel weiterhin Medium mit IVIg. Die Expression des membrangebundenen BAFF wurde in U937-Zellen während einer 24 stündigen Stimulation mit 25 mg/mL IVIg herunter reguliert (dGMean BAFF, unstimuliert:  $16,8 \pm 0,23$ ; IVIg:  $11,29 \pm 0,48$ ; Abb. 21). Wurde IVIg anschließend durch einen Mediumwechsel entfernt und die Zellen für weitere 48 h ohne IVIg inkubiert, stieg die BAFF-Expression wieder auf Ausgangsniveau an (dGMean BAFF, IVIg entfernt:  $16,85 \pm 0,43$ ). Wurden die Zellen auch nach dem Mediumwechsel weiterhin mit IVIg inkubiert, war die bereits beschriebene Herunterregulierung der BAFF-Expression zu detektieren (dGMean BAFF, IVIg:  $5,69 \pm 0,16$ ).



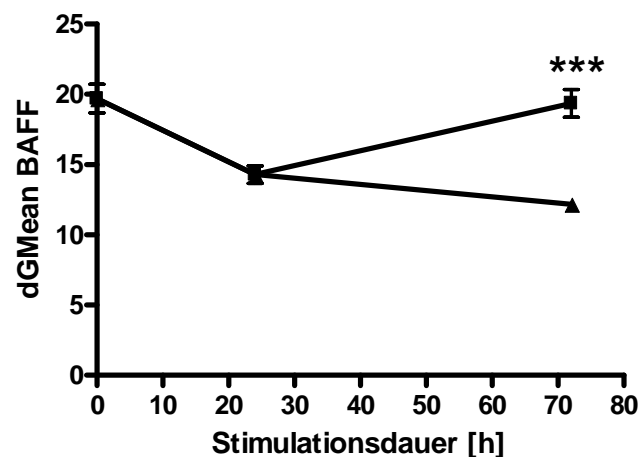
**Abb. 21: Aufhebung der Herabsetzung der Expression von membrangebundenem BAFF in U937-Zellen durch Entfernung von IVIg.**

Nach einer 24 h Inkubation mit 25 mg/mL IVIg wurde das IVIg durch einen Mediumwechsel entfernt und die Zellen für weiter 48 h ohne IVIg inkubiert (Quadrate). Dadurch stieg die Expression des membrangebundenen BAFF auf Ausgangslevel an. Dieser Anstieg war signifikant höher als die Herunterregulierung bei bestehender IVIg-Stimulation (Dreiecke). Die Balken zeigen die Standardabweichung an (SD). \*\*\* =  $p < 0,001$

### 2.3.2 Der Effekt von IVIg auf die intrazelluläre BAFF-Expression in Monozyten ist reversibel

Um zu untersuchen, ob die oben beschriebene Beobachtung von der Reversibilität des IVIg-Effektes auf die Expression von membrangebundenen BAFF auch auf der intrazellulären Expressionsebene stattfindet, wurden U937 Zellen, wie unter 2.3.1 beschrieben, stimuliert.

Auf der Ebene der intrazellulären BAFF-Expression fand ebenfalls eine anfängliche Herabsetzung der Expression durch die 24stündige Stimulation der Zellen mit 25 mg/mL IVIg statt (dGMean BAFF; unstimuliert:  $19,69 \pm 1$ , IVIg:  $14,29 \pm 0,62$ ; Abb. 22), die durch das Entfernen von IVIg nach 48 h wieder Ausgangsniveau erreicht (dGMean BAFF, IVIg entfernt:  $19,36 \pm 0,97$ ). Wurden die Zellen über den gesamten Stimulationszeitraum von 72 h mit IVIg inkubiert, blieb die Herabsetzung der intrazellulären BAFF-Expression bestehen bzw. wurde weiter herabgesetzt (dGMean BAFF, IVIg:  $12,17 \pm 0,24$ ).



**Abb. 22: Aufhebung der Herabsetzung der intrazellulären BAFF-Expression in U937-Zellen nach Entfernen von IVIg.**

Nach einer 24 h Inkubation mit 25 mg/mL IVIg wurde es durch einen Mediumwechsel entfernt und die Zellen für weitere 48 h ohne IVIg inkubiert (Quadrates). Dadurch stieg die Expression des intrazellulären BAFF auf Ausgangslevel an. Dieser Anstieg war signifikant höher als die Herunterregulierung bei bestehender IVIg-Stimulation (Dreiecke). Die Balken zeigen die Standardabweichung an (SD). \*\*\* =  $p < 0,001$

Zusammenfassend konnte mit diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass für eine Aufrechterhaltung des herunter regulierenden Effekts von IVIg auf die Expression des membrangebundenen als auch des intrazellulären BAFF eine ständige Anwesenheit von IVIg notwendig ist. Wird IVIg entfernt, steigt die BAFF-Expression innerhalb von 48 h wieder auf Ausgangsniveau an.

## 2.4 *Gamunex*® im Vergleich mit anderen IVIg-Präparationen

### 2.4.1 Herunterregulierung der membranständigen BAFF-Expression ist unabhängig von der IVIg-Präparation

Bei allen bisherig beschriebenen Versuchen wurde für das eingesetzte IVIg *Gamunex*® 10 % (Talecris) verwendet. Um auszuschließen, dass es sich bei den bisherigen Ergebnissen um produktspezifische Effekte handelt, wurden zwei weitere Präparate untersucht, *Sandoglobulin*® 5 % (Dade Behring) und *Octagam*® 5 % (Octapharma). Bei beiden Präparaten handelt es sich ebenfalls um intravenös-verabreichte Immunglobuline. Sie

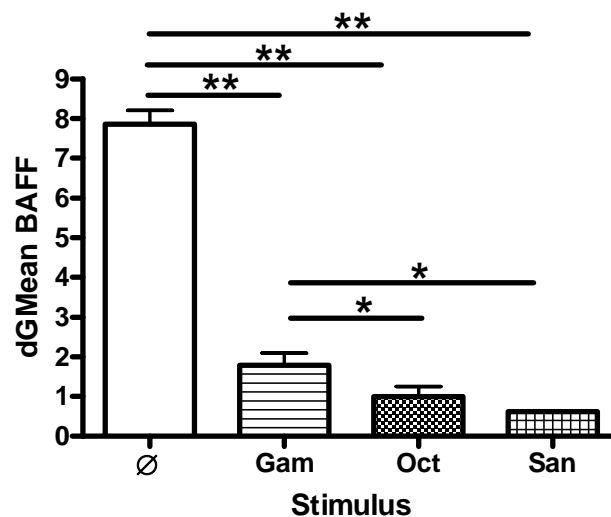
unterscheiden sich von Gamunex in ihrer Immunglobulin-Konzentration und den enthaltenen Zusatzstoffen (Tab. 3).

**Tab. 3: Übersicht der verschiedenen Immunglobulinpräparate zur intravenösen Injektion**

Präparation	<i>Gamunex®</i>	<i>Octagam®</i>	<i>Sandoglobulin®</i>
Firma	Talecris	Octapharma	CSL Behring
Protein/mL	100 mg	50 mg	50 mg
Total IgG	≥ 98 %	≥ 96 %	≥ 95 %
Stabilisator	Glyzin	Maltose	Saccharose

U937-Zellen wurden für 72 h mit den verschiedenen IVIg-Präparationen (25 mg/mL) stimuliert.

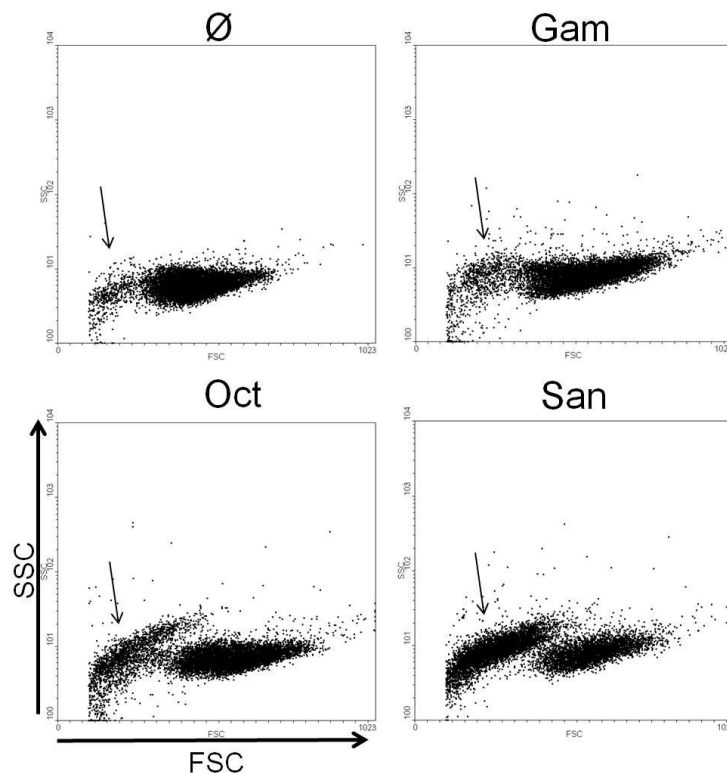
Die Expression des membrangebundenen BAFF wurde durch alle drei untersuchten IVIg-Präparate signifikant reduziert (dGMean: unstimuliert:  $7,86 \pm 0,35$ ; *Gamunex®*:  $1,79 \pm 0,3$ ; *Octagam®*:  $0,99 \pm 0,26$ ; Abb. 23). Die stärkste Reduktion war bei *Sandoglobulin®* zu beobachten (GMean: *Sandoglobulin®*:  $0,62 \pm 0,02$ ).



**Abb. 23: Abnahme des membranständigen BAFF unabhängig von IVIg-Präparation.**

U937-Zellen wurden für 72 h mit 25 mg/mL *Gamunex®* (Gam), *Octagam®* (Oct) oder *Sandoglobulin®* (San) stimuliert. Anschließend wurde die Expression des membrangebundenen BAFF durchflusszytometrisch ermittelt. Gam und Oct resultierten in einer signifikanten Reduktion der BAFF-Expression nach 72 h verglichen mit unstimulierten Zellen (Ø). Die stärkste Reduktion war durch die Behandlung der Zellen mit San zu detektieren. Die Standardabweichung (SD) ist durch kleine Balken dargestellt. \*  $p < 0,01$  bzw.  $0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$

Bei Betrachtung der Punktdiagramme (*Dot plots*), in denen die Zellgröße gegen die Zellgranularität als FSC/SSC-Diagramm aufgetragen ist, war auffällig, dass die IVIg-Präparationen, die die stärksten Effekte auf die membrangebundene BAFF-Expression in U937-Zellen ausübten, Oct und San, eine starke Verdichtung in der Nebenpopulation aufwiesen (Abb. 24). Diese Population, die eine kleinere Partikelgröße und eine geringe Zellgranularität als die Hauptpopulation aufweist, stellt in der Regel den Debris („Zellschrott“) einer Probe dar. Dabei handelt es sich meist um tote Zellen und Zelltrümmer. Die in Abb. 24 dargestellten Daten stammen aus jeweils einer Probe, von der 10.000 Ereignisse aufgezeichnet wurden.



**Abb. 24: Verdichtung der linken Zellpopulation durch Octagam® und Sandoglobulin®.**

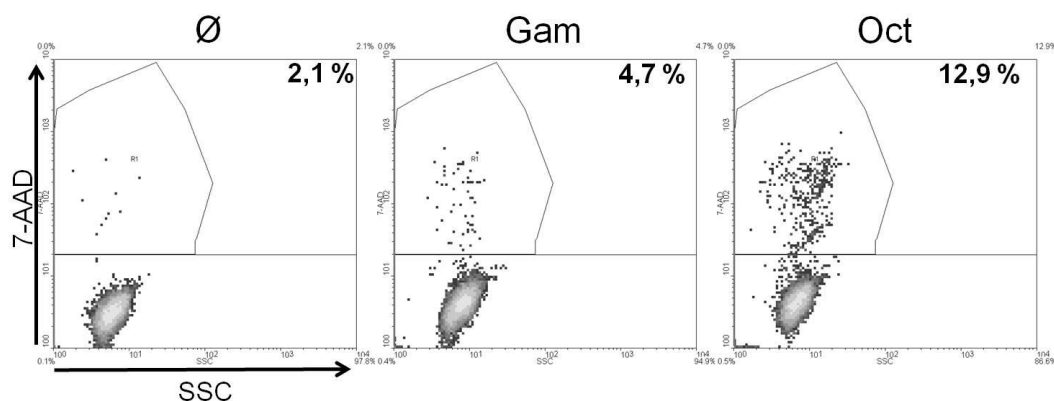
U937-Zellen wurden in einer 72stündigen Stimulation mit 25 mg/mL Gam, Oct und San inkubiert. Die darauffolgende durchflusszytometrische Analyse der Größe (dargestellt im FSC) und der Granularität (dargestellt im SSC) ergab eine ausgeprägte Anreicherung der Zellen im niedrigen Bereich (linke Population, Pfeil), vor allem bei Stimulation mit Oct oder San. Verglichen mit unstimulierten Zellen (Ø) verursachte Gam nur eine schwache Verdichtung.

Um zu ermitteln, ob es sich bei der Zunahme in der linken Zellpopulation um tote Zellen handelte, wurde ein Apoptose-Assay mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) durchgeführt.

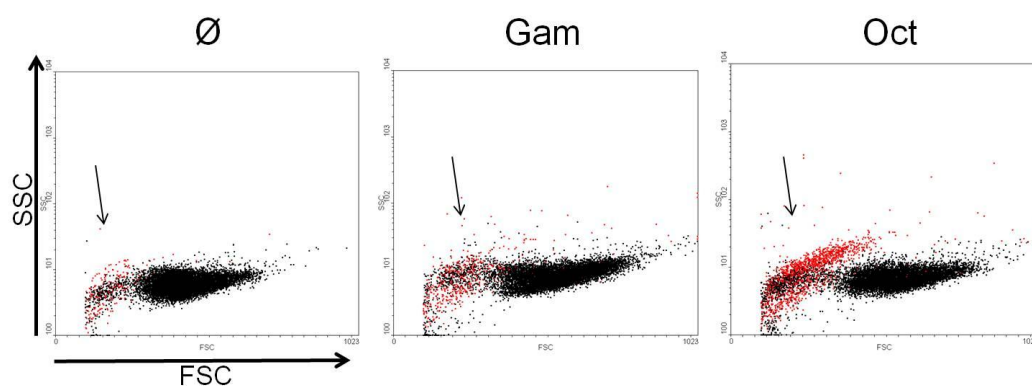
Der basale Anteil apoptotischer Zellen lag bei unstimulierten Proben nach 72stündiger Inkubation bei 2,1 %. Die Stimulation der Zellen mit Gam und Oct führte zu einer Erhöhung des prozentualen Anteils an 7-AAD<sup>+</sup>-Zellen (Gam: 4,7 %; Oct: 12,9 %), d. h. die IVIg-Präparationen verursachten einen Anstieg der Zelltodrate. Gamunex® verursachte mehr als doppelt so viele, Oct mehr als sechs Mal so viele apoptotische Zellen wie in der unstimulierten Probe (Abb. 25 A).

Um festzustellen wo die apoptotischen Zellen im FSC/SSC-Punktdiagramm lokalisiert sind, wurden die 7-AAD<sup>+</sup>-Zellen in den unter Abb. 25 A dargestellten Dichtediagrammen eingerahmt (gated) und die Zellen, die sich in diesem Bereich („Gate“) befanden, erscheinen als rote Ereignisse in den unter Abb. 25 B dargestellten Punktdiagrammen. Die Mehrheit der roten, 7-AAD<sup>+</sup>-Zellen (= apoptotisch) befand sich in der linken Population (Pfeile, Abb. 25 B). Die in Abb. 25 dargestellten Daten sind in A) als Dichtediagramm von jeweils einer Probe à 10.000 Ereignisse abgebildet und in B) als Punktdiagramm, in dem die Zellen aus den Gates der Diagramme unter Abb. 25 A rot dargestellt sind.

A



B





**Abb. 25: Octagam® steigert den Anteil toter Zellen in der 72 h-Kultur von Monozyten.**

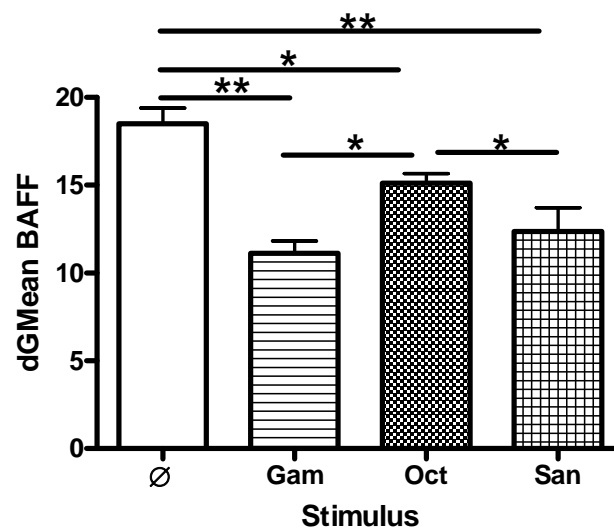
U937-Zellen wurden mit 25 mg/mL Gam und Oct für 72 h stimuliert und anschließend der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen mittels einer 7-AAD-Färbung durchflusszytometrisch erfasst. (A) Gam und Oct führten zu einem Anstieg des prozentualen Anteils von 7-AAD<sup>+</sup>-Zellen (s. Gate) in den 72 h-Kulturen, verglichen mit unstimulierten Zellen. (B) Die Zellen aus dem 7-AAD<sup>+</sup>-Gate (rot) wurden in dem FSC/SSC-Punktdiagramm mit den ungefärbten Zellen überlagert dargestellt. Die dadurch ermöglichte Lokalisierung zeigte einen Zuwachs der 7-AAD<sup>+</sup>-Zellen fast ausschließlich in der linken Population.

Für San konnte dieses Experiment nicht durchgeführt werden, da nicht mehr genug Wirkstoff zur Verfügung stand. Der Vergleich der FSC/SSC-Punktdiagramme der Zellen, die mit 25 mg/mL Oct und San für 72 h stimuliert wurden (Abb. 24), lässt allerdings vermuten, dass es sich mit San ähnlich verhält wie mit Oct: die Zunahme in der linken Population des Punktdiagramms ist auf einen erhöhten Zelltod zurückzuführen.

#### **2.4.2 Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression ist unabhängig von der IVIg-Präparation**

Dazu wurden U937-Zellen für 72 h, wie unter 2.4.1 beschrieben, stimuliert und die intrazelluläre BAFF-Expression gemessen.

Die BAFF-Expression wurde auch im intrazellulären Raum von allen getesteten IVIg-Präparationen signifikant herunter reguliert (dGMean: unstimuliert:  $18,51 \pm 0,88$ ; Gam:  $11,12 \pm 0,7$ ; Oct:  $15,13 \pm 0,53$ ; San:  $12,38 \pm 1,34$ ; Abb. 26). Allerdings war in diesem Kompartiment der Effekt bei Gam am stärksten, gefolgt von San. Oct verursachte den schwächsten Effekt, der aber trotzdem noch signifikant gegenüber der BAFF-Expression in unstimulierten Zellen war.



**Abb. 26: Verringerung der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten unabhängig von der IVIg-Präparation.**

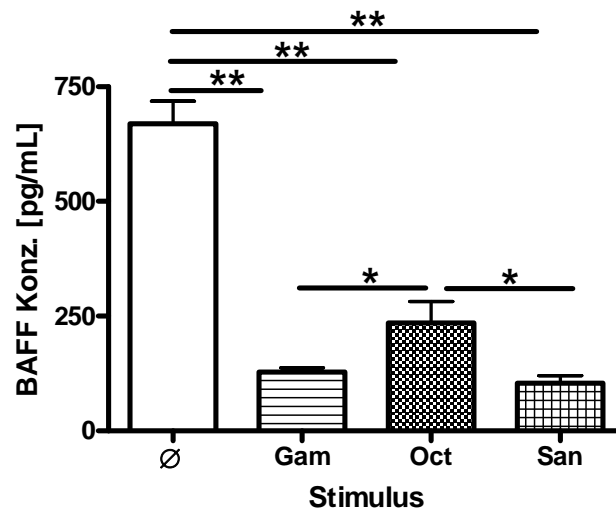
U937-Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 h mit 25 mg/mL unterschiedlicher IVIg-Präparationen, Gam, Oct und San, stimuliert. Die darauffolgende durchflusszytometrisch Untersuchung ergab eine signifikante Verringerung der intrazellulären BAFF-Expression durch alle drei Präparationen verglichen mit unstimulierten Zellen (Ø). Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken dargestellt. \* =  $p < 0,01$  bzw. 0,05; \*\* =  $p < 0,001$

Somit wurden die Ergebnisse aus der Messung der membranständigen Expression von BAFF mit den Resultaten der intrazellulären Messung bestätigt, da ebenfalls alle untersuchten IVIg-Präparationen zu signifikanten Verringerungen der Expression von BAFF führten. Untereinander jedoch variierten die IVIg-Präparationen in der Stärke ihres Effekts. Im Gegensatz zur extrazellulären Ebene, wo Gam den schwächsten Effekt hatte, löste es intrazellulär den stärksten Effekt aus (Vergleich Abb. 23 und Abb. 26).

### 2.4.3 Verringerung der BAFF-Freisetzung in Monozyten ist unabhängig von der IVIg-Präparation

Nachdem die mit Gam bereits beobachteten Ergebnisse auf den Ebenen der membrangebundenen und der intrazellulären BAFF-Expression auch mit anderen IVIg-Präparationen, Oct und San, bestätigt worden waren, wurde untersucht ob es auf Ebene der Freisetzung von löslichem BAFF signifikante Unterschiede zwischen den Effekten der unterschiedlichen IVIg-Präparationen gibt. Dazu wurde die Konzentration des löslichen BAFF in Kulturüberstände von U937-Zellen, die 72 h mit 25 mg/mL der verschiedenen Präparationen stimuliert worden waren, mittels ELISA gemessen und analysiert.

Nach 72 h Inkubation verursachten Gam und San eine signifikante Verringerung der BAFF-Freisetzung in U937-Zellen, verglichen mit unstimulierten Zellen. Oct verursachte eine weniger starke, aber trotzdem noch signifikante Verringerung der BAFF-Freisetzung (BAFF-Konz. [pg/mL]: unstimuliert:  $669,08 \pm 49,08$ ; Gam:  $128,55 \pm 8,85$ ; Oct:  $235,25 \pm 46,82$ ; San:  $103,95 \pm 16,06$ ; Abb. 27).



**Abb. 27: Verringerte Freisetzung von BAFF in Monozyten durch diverse IVIg-Präparationen.**

Die Konzentration von löslichem BAFF wurde in Kulturüberständen von U937-Zellen nach 72 stündiger Stimulation mit 25 mg/mL Gam, Oct und San mittels ELISA gemessen. Alle drei Präparate resultierten in einer Herabsetzung der BAFF-Konzentration in den Kulturüberständen, verglichen mit unstimulierten Zellen (Ø). Der Effekt von San war mit Gam vergleichbar. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken dargestellt. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,001$

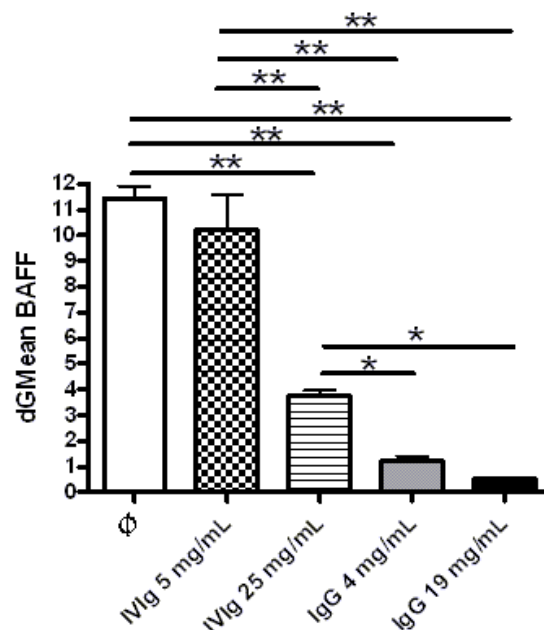
Zusammenfassend konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass die bereits zu Anfang in dieser Arbeit detektierte Herunterregulierung der BAFF-Expression auf membranständiger und intrazellulärer Ebene sowie die Freisetzung durch IVIg in Form von Gam nicht Präparat-spezifisch ist. Verglichen mit unstimulierten Zellen konnte nämlich auch für die anderen beiden untersuchten Präparate, Oct und San, eine signifikante Verringerung von BAFF auf diesen drei Ebenen gezeigt werden. Vergleicht man die drei Präparate untereinander ergaben sich auf der ein oder anderen Ebene Verschiebungen, welches den stärksten und welches den schwächsten Effekt auslöste. Hinsichtlich der Verträglichkeit für die Zellen unterschieden sich die Präparate deutlich voneinander: Oct löste bei drei Mal mehr Zellen Apoptose aus als Gam.

## 2.5 IVIg im Vergleich mit IgG

### 2.5.1 Isoliertes humanes IgG reguliert die Expression von membranständigem BAFF in Monozyten herunter

Industriell hergestellte Immunglobulin-Präparate durchlaufen aufwendige Verarbeitungsschritte z. B. zur Fraktionierung und zur Entfernung von Viruspartikeln bevor sie dem Patient intravenös verabreicht werden können. Um zu untersuchen, ob durch diese Aufarbeitungen die biologische Aktivität verändert wird, wurde im eigenen Labor humanes Immunglobulin G (IgG) aufgereinigt. Dazu wurden Blut von drei gesunden Spendern abgenommen und daraus mittels Affinitätschromatographie mit einer Protein G-Säule IgG isoliert (s. Methoden, S. 53f). Anschließend wurden Zellen der Linie U937 mit zwei verschiedenen Konzentrationen dieser IgG-Präparation (4 und 19 mg/mL) für 72 h stimuliert. Nachdem eine Zugabe von Glyzin (50 mM) zu dem aufgereinigten IgG in einem Vorversuch keinen Einfluss auf das Ergebnis hatte (Daten nicht gezeigt), wurde es der Präparation für alle weiteren Experimente als Stabilisator zugesetzt.

Nach 72 h Inkubation der U937 Zellen mit isoliertem IgG sank die Expression des membrangebundenen BAFF signifikant ab (dGMean BAFF: unstimuliert:  $11,46 \pm 0,46$ ; 4 mg/mL IgG:  $1,23 \pm 0,18$ ; 19 mg/mL IgG:  $0,51 \pm 0,07$ ; Abb. 28). Diese Abnahme war auch signifikant im Vergleich zu der Abnahme der BAFF-Expression durch IVIg-Stimulation (dGMean BAFF: 5 mg/mL IVIg:  $10,21 \pm 1,4$ ; 25 mg/mL:  $3,75 \pm 0,23$ ; Abb. 28).

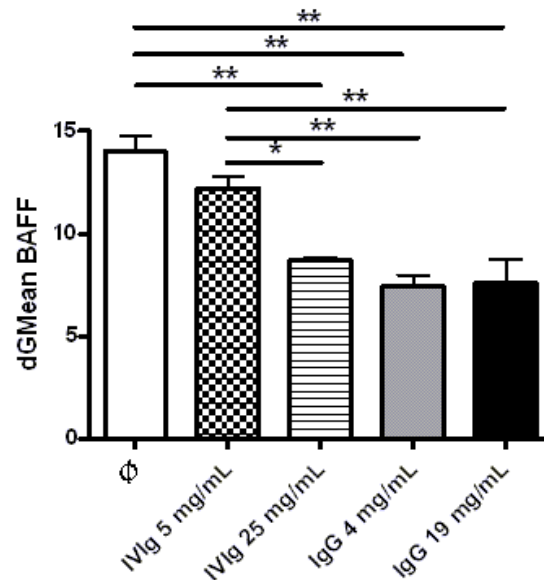


**Abb. 28: Abnahme der Expression des membrangebundenen BAFF in Monozyten durch humanes IgG.**

U937-Zellen wurden für 72 h mit zwei Konzentrationen aufgereinigtem, gepooltem IgG, 4 (grau) und 19 mg/mL (schwarz), stimuliert. Anschließend wurde die Expression des membranständigen BAFF mittels Durchflusszytometrie detektiert. Verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß) wurde die membrangebundene BAFF-Expression signifikant durch aufgereinigtes, gepooltes IgG reduziert. Dieser Effekt war auch signifikant stärker als die für beide IVIg-Konzentrationen, 5 (kariert) und 25 (gestreift) mg/mL, bisher beobachtete Verringerung der membrangebundenen BAFF-Expression. Die dünnen Balken geben die Standardabweichung (SD) an. \* =  $p < 0,01$ ; \*\* =  $p < 0,001$

**2.5.2 Isoliertes humanes IgG reguliert die Expression von intrazellulärem BAFF in Monozyten herunter**

Um die Auswirkung des eigens isolierten IgG auf die Expression von intrazellulären BAFF zu untersuchen, wurden U937-Zellen für 72 h mit zwei Konzentrationen IgG, 4 und 19 mg/mL, stimuliert. IgG führte zu einer signifikanten Senkung der intrazellulären BAFF-Expression (dGMean: unstimuliert:  $14,01 \pm 0,78$ ; 4 mg/mL IgG:  $7,44 \pm 0,53$ ; 19 mg/mL IgG:  $7,6 \pm 1,34$ ; Abb. 29). Dieser Effekt war nicht konzentrationsabhängig, aber signifikant stärker als durch das industriell hergestellte IVIg (dGMean BAFF: 5 mg/mL IVIg:  $12,19 \pm 0,61$ ; 25 mg/mL IVIg:  $8,7 \pm 0,16$ ; Abb. 29).



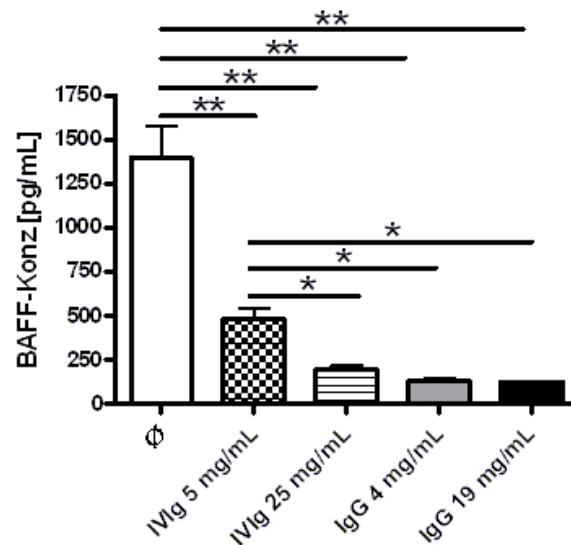
**Abb. 29: Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten durch humanes IgG.**

Zellen der Linie U937 wurden mit zwei Konzentrationen aufgereinigtem, gepooltem IgG, 4 (grau) und 19 mg/mL (schwarz), für 72 h stimuliert. Im Anschluss wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression des intrazellulär lokalisierten BAFF gemessen. Die Zugabe von IgG führte zu einer signifikanten Verringerung der intrazellulären BAFF-Expression in U937 verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß). Die durch IgG hervorgerufene Herunterregulierung war ebenfalls signifikant stärker als die bisher beobachtete Verringerung der intrazellulären BAFF-Expression durch IVIg (5 mg/mL: kariert, 25 mg/mL: liniert). Die Standardabweichung (SD) ist in dünnen Balken angezeigt. \* =  $p < 0,01$ ; \*\* =  $p < 0,001$

### 2.5.3 Humanes IgG führt zu einer Reduktion der BAFF-Freisetzung in Monozyten

Zusätzlich zu den Effekten von humanem IgG auf die Expression von BAFF wurde auch der Effekt auf die Freisetzung von BAFF in Monozyten untersucht. Dazu wurden U937-Zellen für 72 h mit 4 und 19 mg/mL IgG stimuliert und anschließend die Kulturüberstände im ELISA gemessen.

Humanes IgG resultierte in einer signifikant reduzierten Freisetzung des löslichen BAFF (BAFF-Konz. [pg/mL]: unstimuliert:  $1393 \pm 182$ ; 4 mg/mL IgG:  $129,6 \pm 12,5$ ; 19 mg/mL IgG:  $125,1 \pm 2,3$ ; Abb. 30). Diese Reduktion war ebenfalls signifikant stärker als die durch IVIg hervorgerufene Herabsetzung der Konzentration von löslichem BAFF in den Überständen (BAFF-Konz. [pg/mL]: 5 mg/mL IVIg:  $477,9 \pm 64$ ; 25 mg/mL IVIg:  $193,9 \pm 19,8$ ; Abb. 30).



**Abb. 30: Herunterregulierung der BAFF-Freisetzung in Monozyten durch humanes IgG.**

U937-Zellen wurden für 72 h mit zwei Konzentrationen, 4 und 19 mg/mL, humanem, gepooltem IgG stimuliert. Danach wurde die Konzentration von löslichem BAFF in den Kulturüberständen mittels ELISA gemessen. In den Kulturüberständen der IgG-behandelten Zellen war die Konzentration des löslichen BAFF im Vergleich zu den Kulturüberständen unstimulierter Zellen (weiß) signifikant niedriger (4 mg/mL: grau; 19 mg/mL: schwarz). Verglichen mit IVIg-behandelten Zellen, 5 (kariert) und 25 (liniert) mg/mL, konnte durch IgG weniger lösliches BAFF in den Überständen detektiert werden. Die Standardabweichung (SD) ist als dünne Balken angegeben. \* =  $p < 0,01$  bzw. 0,05; \*\* =  $p < 0,001$

Zusammenfassend wurde mit diesen Versuchen gezeigt, dass isoliertes, gepooltes, humanes IgG einen nicht minder starken herunter regulierenden Effekt auf die Expression von membranständigen und intrazellulären sowie die Freisetzung von BAFF in Monozyten hat wie IVIg.

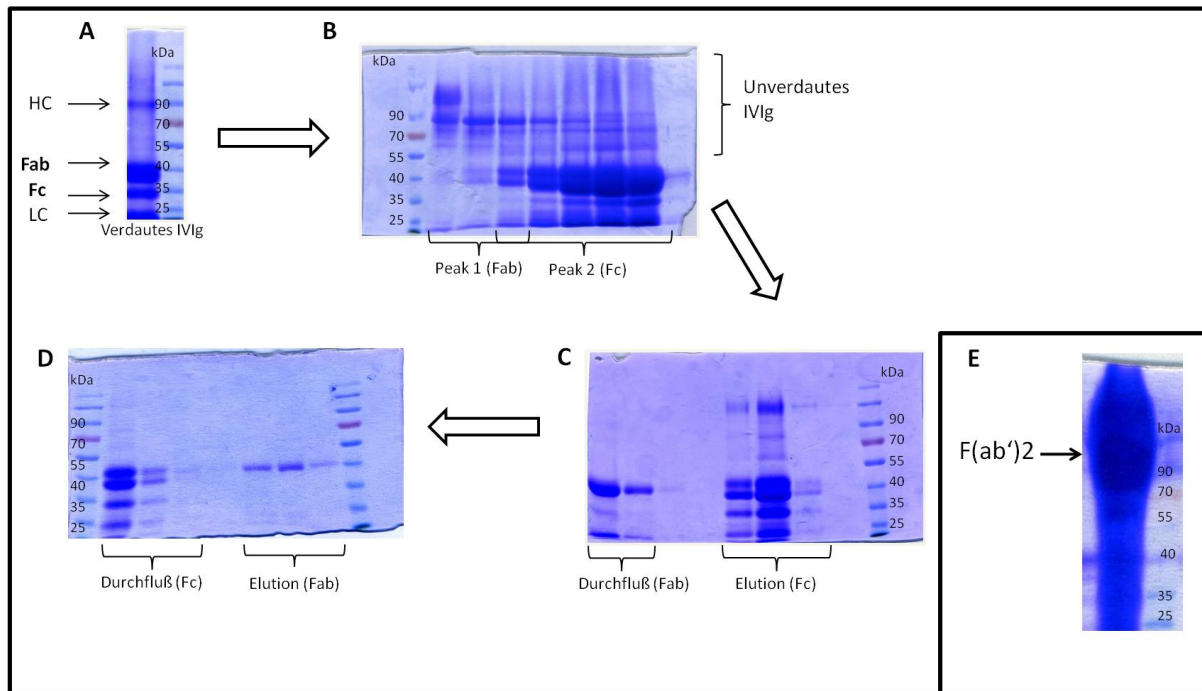
## 2.6 Abhängigkeit der IgG-Wirkung von der Region des Moleküls

Da gezeigt werden konnte, dass der Hauptbestandteil des IVIg, IgG, für dessen Wirkung auf die Expression von BAFF in Monozyten verantwortlich ist, stellte sich nun die Frage, ob eine bestimmte Region des IgG diese Wirkung vermittelt.

### **2.6.1 F(ab')<sub>2</sub> vermittelt die herunter regulierende Wirkung von IVIg auf die Expression des membranständigen BAFF in Monozyten**

Um die Frage nach einem effektauslösenden Bestandteil von IgG zu adressieren, wurde zunächst versucht die im IVIg enthaltenen Immunglobuline in ihre beiden Fraktionen, Fab und Fc, zu separieren. Nach dem enzymatischen Verdau von IVIg mit Papain wurde versucht die dabei entstandenen Fraktionen erst mittels Größenausschluß-Chromatographie und anschließend mit Affinitätschromatographie aufzutrennen. Nach jedem Trennungsschritt wurden einzelne Fraktionen in SDS-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt, um die Reinheit zu kontrollieren. Bevor die verdaute Probe chromatographisch aufgetrennt wurde, waren auf dem SDS-Gel unter nicht-denaturierenden Bedingungen Fab- und Fc-Fragmente, schwere und leichte Ketten sowie unverdautes IVIg zu sehen (Abb. 31 A). Nach dem ersten chromatographischen Schritt, der Größenausschluss-Chromatographie, deutete sich eine Fraktionierung auf dem Gel an: in den Fraktionen des ersten Peaks der Auftrennung waren vor allem Fragmente bis ca. 40 kDa, also hauptsächlich unverdautes IVIg enthalten. In den Fraktionen des zweiten Peaks waren die kleineren Bestandteile enthalten wie Fc- und Fab-Fragmente (Abb. 31 B). Durch den anschließenden Einsatz einer ProteinA-Säule gelang es das unverdaute IVIg aus den Fab-Fraktionen größtenteils zu entfernen, allerdings enthielten sie im Anschluss immer noch geringe Anteile Fc-Fragment. Die Fc-Fraktionen enthielten immer noch hohe Anteile an Fab-Fragmenten und unverdaulichem IVIg (Abb. 31 C). Nach dem letzten chromatographischen Schritt, die Verwendung einer ProteinL-Säule, enthielt der Säulendurchfluss Fab- und Fc-Fragmente, die Elution nur Fab-Fragmente. Somit gelang es bis zuletzt nicht die Fc-Fraktion sauber aufzutrennen (Abb. 31 D).





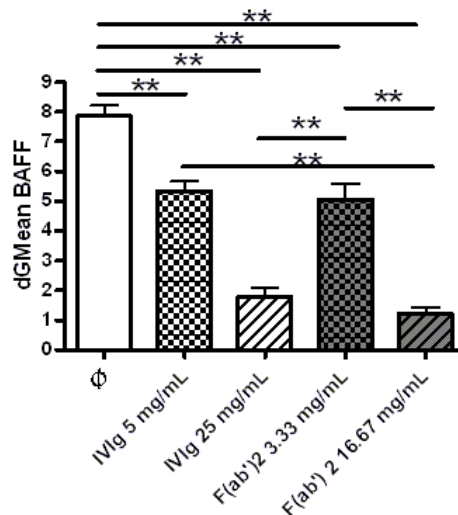
**Abb. 31: Chromatographische Auftrennung von IVIg nach Papain-Verdau.**

Um die Fab- von den Fc-Fragmenten zu trennen wurde IVIg mit Papain verdaut. (A) Eine Probe des Verdau wurde elektrophoretisch im SDS-Gel zur Kontrolle aufgetrennt. Es folgten (B) Größenausschluss-Chromatographie, (C) Affinitäts-Chromatographie mit einer ProteinA-Säule sowie (D) Affinitätschromatographie mit einer ProteinL-Säule. Auch nach dem finalen Schritt (D) waren Fab-Fragmente (Doppelbande bei 40 kDa) in der Fc-Fraktion enthalten. Die Fab-Fraktion war allerdings frei von Fc-Kontaminationen. (E) Reine F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente (ca. 100 kDa) von Dr. S. V. Kaveri nach Pepsin-Verdau des IVIg. Fab: Fab-Fragment; Fc: Fc-Fragment; HC: schwere Kette; LC: leichte Kette; F(ab')<sub>2</sub>: F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; kDa: Kilodalton

Um diese Fragestellung trotzdem adressieren zu können, stellte uns Dr. S. V. Kaveri des „Institut national de la santé et de la recherche médical“ (INSERM) in Paris netterweise F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente zur Verfügung (elektrophoretische Auftrennung; Abb. 31 E). Gewonnen wurden diese F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente durch enzymatische Spaltung der intravenösen Immunglobuline mit Pepsin und anschließender chromatographischer Aufreinigung mittels ProteinG-Säule.

U937-Zellen wurden mit diesen F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten über einen Zeitraum von 72 h stimuliert. Die verschiedenen F(ab')<sub>2</sub>-Konzentrationen, 3,33 und 16,6 mg/mL, wurden so gewählt, dass sie den Fab-Anteilen der zuvor verwendeten IVIg-Konzentrationen (5 und 25 mg/mL) entsprachen. Die anschließende Analyse des membrangebundenen BAFF ergab, dass die F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente des Immunglobulins eine signifikante Herunterregulierung verursachten. Diese Wirkung war konzentrationsabhängig und vergleichbar mit dem vollständigen IVIg

(dGMean: unstimuliert:  $7,86 \pm 0,35$ ; 3,33 mg/mL F(ab')<sub>2</sub>:  $5,07 \pm 0,52$ ; 16,6 mg/mL F(ab')<sub>2</sub>:  $1,22 \pm 0,19$ ; 5 mg/mL IVIg:  $5,35 \pm 0,32$ ; 25 mg/mL IVIg:  $1,79 \pm 0,3$ ; Abb. 32).



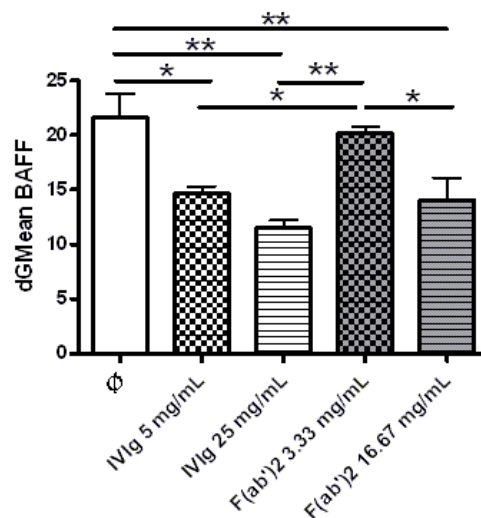
**Abb. 32: Herabsetzung von membranständigem BAFF durch F(ab')<sub>2</sub> in Monozyten.**

U937-Zellen wurden für 72 h mit 3,33 (grau kariert) und 16,67 mg/mL (grau liniert) F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten stimuliert. Anschließend wurde die membranständige BAFF-Expression durchflusszytometrisch bestimmt (n = 3). Verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß) nahm die Expression konzentrationsabhängig und signifikant durch F(ab')<sub>2</sub> ab. Die Abnahme der membranständigen BAFF-Expression war mit Gamunex bei beiden Konzentration, 5 (weiß kariert) und 25 (grau kariert) mg/mL, vergleichbar. Die Standardabweichung (SD) ist durch kleine Balken dargestellt. \*\* = p < 0,001

### 2.6.2 F(ab')<sub>2</sub> vermittelt die herunter regulierende Wirkung von IVIg auf die intrazelluläre BAFF-Expression in Monozyten

Um die Auswirkung des F(ab')<sub>2</sub> auf die Expression von intrazellulären BAFF zu untersuchen, wurden U937-Zellen für 72 h mit zwei Konzentrationen F(ab')<sub>2</sub>-Fragment, 3,33 und 16,67 mg/mL, stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Die Expression des intrazellulären BAFF wurde ebenfalls durch F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente verringert, allerdings nur durch die hohe eingesetzte Konzentration von 16,6 mg/mL (Abb. 33). Die Herunterregulierung durch die niedrigere F(ab')<sub>2</sub>-Konzentration war auf dieser Ebene weniger stark wie mit der entsprechenden Gesamt-IVIg-Konzentration. Allerdings war der Effekt der hohen F(ab')<sub>2</sub>-Konzentration vergleichbar mit der niedrigeren Konzentration des Gesamt-IVIg (dGMean: unstimuliert:  $21,57 \pm 2,25$ ; 5 mg/mL IVIg:  $14,61 \pm 0,74$ ; 25 mg/mL IVIg:  $11,5 \pm 0,7$ ; 3,33 mg/mL F(ab')<sub>2</sub>:  $20,13 \pm 0,7$ ; 16,6 mg/mL F(ab')<sub>2</sub>:  $14,03 \pm 2,09$ ; Abb. 33).



**Abb. 33: Herabsetzung der intrazellulären BAFF-Expression durch F(ab')<sub>2</sub> in Monozyten.**

U937-Zellen wurden für 72 h mit 3,33 (grau kariert) und 16,67 mg/mL (grau liniert) F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten stimuliert. Anschließend wurde die intrazelluläre BAFF-Expression durchflusszytometrisch bestimmt (n = 3). Verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß) nahm die Expression konzentrationsabhängig durch F(ab')<sub>2</sub> ab. Die Abnahme der intrazellulären BAFF-Expression war mit Gamunex® bei beiden Konzentration, 5 (weiß kariert) und 25 (grau kariert) mg/mL, stärker wie mit F(ab')<sub>2</sub>. Die Standardabweichung (SD) ist durch kleine Balken dargestellt. \* = p < 0,01 bzw. 0,05; \*\* = p < 0,001

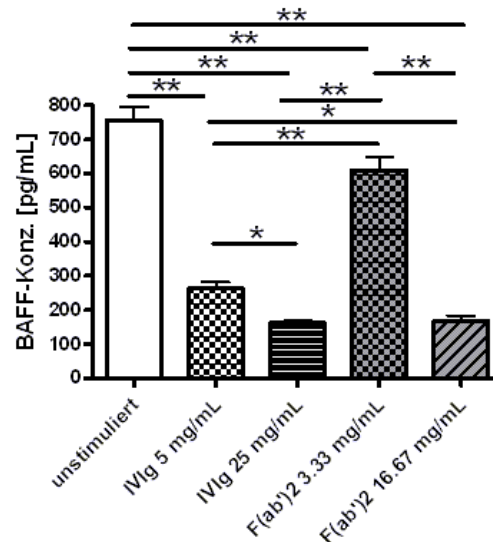
Zusammenfassend konnte mit diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment aus IVIg-Präparationen einen vergleichbar starken Effekt auf die membrangebundene und intrazelluläre Expression von BAFF in Monozyten hat wie die gesamte IVIg-Präparation.

### 2.6.3 F(ab')<sub>2</sub> vermittelt die herunter regulierende Wirkung von IVIg auf die Freisetzung des löslichen BAFF in Monozyten

Schließlich wurde der Effekt von F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten auf die Freisetzung von BAFF in Monozyten untersucht. Dazu wurde das lösliche BAFF in Kulturüberständen von U937-Zellen, die 72 h wie unter 2.6.1 beschrieben, stimuliert worden waren, mittels ELISA analysiert.

Die 72stündige Inkubation von U937-Zellen resultierte in einer verminderten Freisetzung von BAFF (Abb. 34). Dieser Effekt war signifikant und konzentrationsabhängig (BAFF-Konz. [pg/mL]: unstimuliert: 756,56 ± 39,64 mg/mL; 3,33 mg/mL F(ab')<sub>2</sub>: 609,64 ± 38,91; 16,6 mg/mL F(ab')<sub>2</sub>: 168,21 ± 16,08) verglichen mit unstimulierten Zellen. Auf dieser Ebene

war nur der Effekt der höheren  $F(ab')_2$ -Konzentration vergleichbar mit dem der hohen Gesamt-IVIg-Konzentration, bei der jeweils niedrigeren Konzentration war der Effekt des Gesamt-IVIg signifikant stärker (BAFF-Konz. [pg/mL]: 5 mg/mL IVIg:  $263,78 \pm 18,13$ ; 25 mg/mL IVIg:  $162 \pm 5,8$ ).



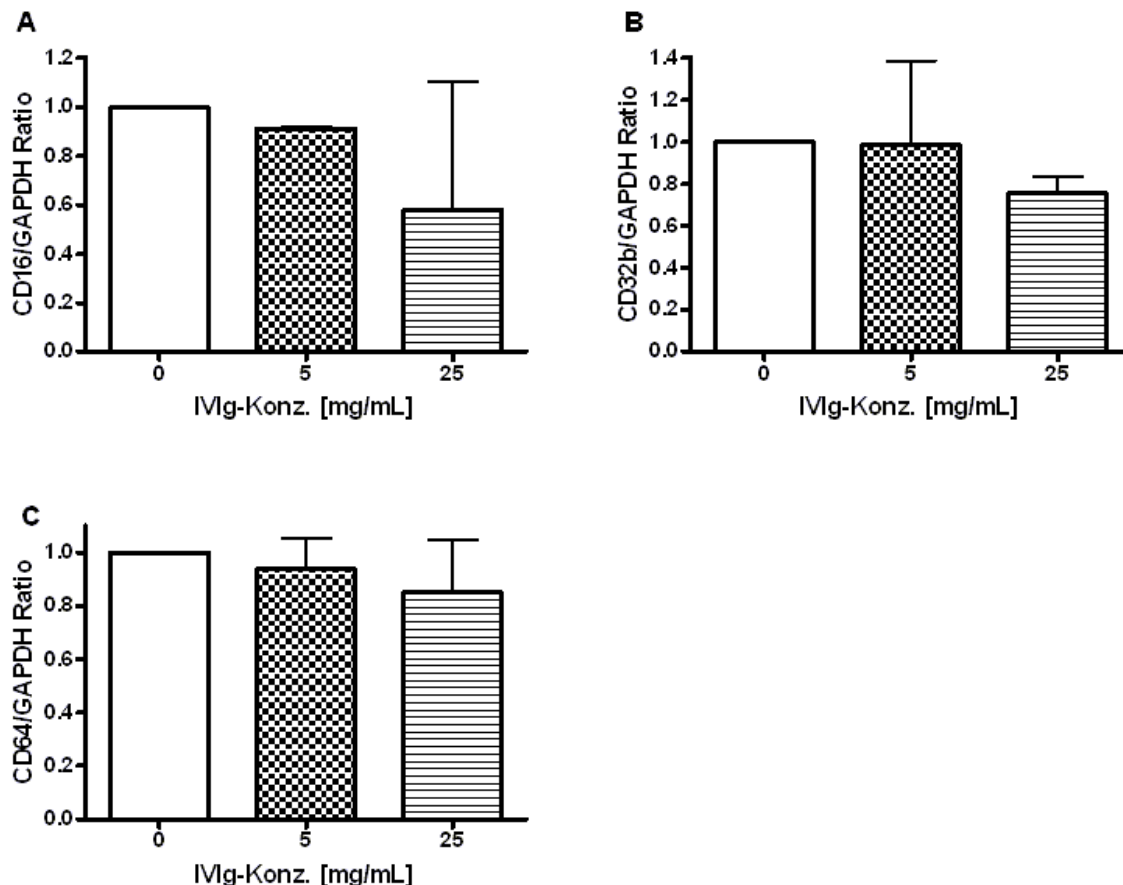
**Abb. 34:  $F(ab')_2$ -Fragment vermittelt Verringerung der Freisetzung von BAFF in Monozyten.**

U937-Zellen wurden 72 h mit 3,33 (grau kariert) und 16,67 (grau liniert) mg/mL  $F(ab')_2$ -Fragment stimuliert und anschließend die Konzentration von löslichem BAFF in den Kulturüberständen mittels ELISA gemessen. Verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß) führt  $F(ab')_2$ -Fragment zu einer signifikanten und konzentrationsabhängigen Abnahme der BAFF-Freisetzung in den Überständen. Verglichen mit den beiden IVIg-Konzentrationen, 5 (weiß kariert) und 25 mg/mL (weiß liniert), war die Abnahme der BAFF-Freisetzung durch  $F(ab')_2$ -Fragment schwächer. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken dargestellt. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,001$

## 2.7 Einfluss von IVIg auf die Transkriptionslevel von Fcγ-Rezeptoren in Monozyten

Aufgrund der Tatsache, dass in IVIg-Präparationen sowohl der Fab- als auch der Fc-Teil immunmodulatorisch aktiv sein kann (Bayry et al. 2003), wurden die Transkriptionslevel der FcγRs, CD16 (FcγRIIIa), CD32b (FcγRIIb) und CD64 (FcγRIa), untersucht. Dazu wurden U937-Zellen mit 5 und 25 mg/mL IVIg für 6 bzw. 24 h stimuliert und anschließend die mRNA-Isoliert, welche dann in cDNA umgeschrieben wurde. Diese wurde als Template in die Echtzeit-PCR eingesetzt und die Expressionslevel durch die Normalisierung mit einem HSK (GAPDH) und einer Effizienz-korrigierten Quantifizierung errechnet. Daraus ergab sich

die konzentrationsabhängige Abnahme der beiden aktivierenden FcγR, CD16 und CD64, sowie des inhibierenden FcγR, CD32b (CD16/GAPDH Ratio, 6 h: unstimuliert:  $1 \pm 0$ ; 5 mg/mL IVIg:  $0,91 \pm 0,01$ ; 25 mg/mL IVIg:  $0,58 \pm 0,53$ ; CD32b/GAPDH Ratio, 24 h:  $1 \pm 0$ ; 5 mg/mL IVIg:  $0,99 \pm 0,4$ ; 25 mg/mL IVIg:  $0,76 \pm 0,08$ ; CD64/GAPDH Ratio, 24 h: unstimuliert:  $1 \pm 0$ ; 5 mg/mL IVIg:  $94 \pm 0,11$ ; 25 mg/mL IVIg:  $0,85 \pm 0,2$ ; Abb. 35).



**Abb. 35: Modulation der Transkriptionslevel von Fcγ-Rezeptoren in Monozyten durch IVIg.**

U937-Zellen wurden für 6 bzw. 24 h mit 5 (kariert) und 25 mg/mL IVIg (liniert) stimuliert. Anschließend wurde die mRNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde als Template in die quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt. Über relative Quantifizierung wurde die Zielgen/GAPDH Ratio ermittelt. Verglichen mit unstimulierten Zellen wurden die Transkriptionslevel von (A) CD16 nach 6 h, (B) CD32b und (C) CD64 nach 24 h reduziert. Die dünnen Balken geben die Standardabweichung (SD) an.  $p > 0,05$

Zusammenfassend konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass IVIg zu einer (meist) signifikanten Abnahme der BAFF-Expression auf Protein- (extra- und intrazellulär) und mRNA-Ebene sowie der Freisetzung in Monozyten führt (Tab. 4). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass für die Aufrechterhaltung dieser Effekte die ständige Anwesenheit von

IVIg notwendig ist. Die Ergebnisse gaben außerdem Hinweis darauf, dass die Effekte von IVIg F(ab')<sub>2</sub>-abhängig und -unabhängig sein können.

**Tab. 4: Übersicht der Resultate aus Schlüsselexperimenten mit IVIg**

Zellen	Expressions- level	Stimulations- dauer [h]	Stimulus	Wert	Abnahme [%]
U937	Protein (Membran)	72	Ø	22,8	-
			IVIg, 5 mg/mL	21,4	6,1
			IVIg, 25 mg/mL	8,2	64,1
	[dGMean]				
	Protein (Zytoplasma)	72	Ø	25,1	-
			IVIg, 5 mg/mL	23	8,4
			IVIg, 25 mg/mL	19,6	22,1
	[dGMean]				
	Freisetzung  (BAFF-Konz. [pg/mL])	72	Ø	671,4	-
			IVIg, 5 mg/mL	506,4	24,6
			IVIg, 25 mg/mL	300,6	55,2
	mRNA  (BAFF/GAPDH Ratio)	24	Ø	1	-
			IVIg, 5 mg/mL	0,6	44
			IVIg, 25 mg/mL	0,2	79
Prim. Monozyten	Protein (Membran) [dGMean]	72	LPS + Ø	13,1	-
			LPS + IVIg, 25 mg/mL	2,3	82,5
	Protein (Zytoplasma) [dGMean]	72	LPS + Ø	8	-
			LPS + IVIg, 25 mg/mL	3,4	57,3
	Freisetzung (BAFF-Konz. [pg/mL])	72	LPS + Ø	129,4	-
			LPS + IVIg, 25 mg/mL	83,9	35,2

### **3. Wirkung von immunsuppressiven Glucocorticoiden auf die Expression und Freisetzung von BAFF in Monozyten**

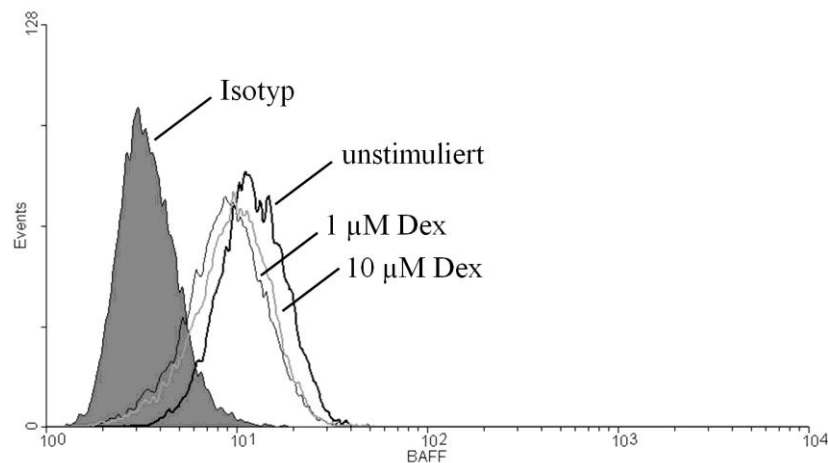
Synthetische Glucocorticoide sind Hormonderivate, die aufgrund ihrer antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung seit vielen Jahrzehnten in der Medizin zur Behandlung von chronisch-entzündlichen und Autoimmunerkrankungen, wie Rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose eingesetzt werden (Rhen und Cidlowski 2005; De Bosscher und Haegeman 2009). Ein Gros der mit Glucocorticoiden behandelten Erkrankungen steht in unmittelbarem Zusammenhang mit einer Dysregulation des B-Zell-aktivierenden Faktors BAFF (Cheema et al. 2001; Krumbholz et al. 2005). Vor diesem Hintergrund stellte sich nun die Frage ob Glucocorticoide Einfluss auf die BAFF-Expression und Sekretion von Monozyten als wichtigstem BAFF-produzierenden Zelltyp nehmen.

#### **3.1 Effekte von Dexamethason**

##### **3.1.1 Dexamethason reduziert die Expression von membrangebundenem BAFF in Monozyten**

Daher wurde in dieser Arbeit zunächst der Einfluss von Glucocorticoiden auf die Expression des membranständigen BAFF in Monozyten untersucht. Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit Dexamethason (Dex) durchgeführt, einem synthetischen Glucocorticoid, das ca. 40-mal stärker als das körpereigene Cortison wirkt.

U937-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit zwei Dex-Konzentrationen, 1 und 10  $\mu\text{M}$ , oder als Kontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO; Endkonz.: 0,1 %) stimuliert. In Abb. 36 ist beispielhaft das Histogramm einer durchflusszytometrischen Messung von U937-Zellen nach 72 h dargestellt. Die Isotypkontrolle war negativ für die Oberflächenantigene der untersuchten Zellen. Die Kurven der Dex-behandelten Zellen lagen im Histogramm verglichen mit den unstimulierten Zellen nach links versetzt. Diese Linksverschiebung zeigte eine Abnahme der BAFF-Expression durch Dex an.



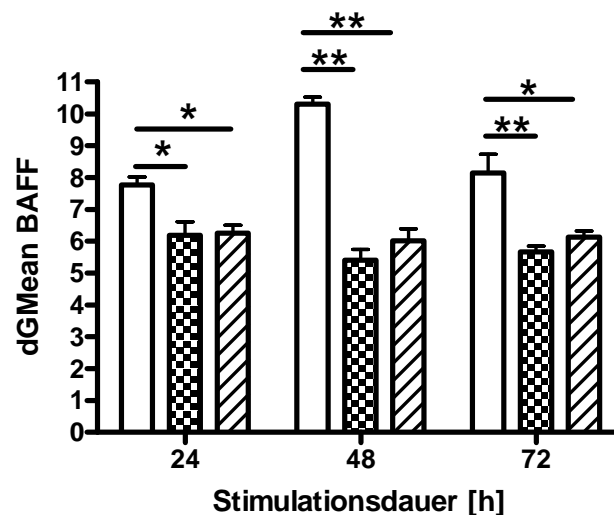
**Abb. 36: Abnahme der membrangebundenen BAFF-Expression in Monozyten durch Dexamethason.**

U937-Zellen wurden für 72 h mit 1 und 10 µM Dex stimuliert. Anschließend wurde die Expression des membrangebundenen BAFF durchflusszytometrisch gemessen. Dex verursachte durch beide Konzentrationen eine Expressionsabnahme verglichen mit den unstimulierten Zellen.

Die BAFF-Expression auf der Oberfläche der U937-Zellen wurde durch Dex herunter reguliert.

Bereits nach 24 h wurde eine Dex-vermittelte signifikante Abnahme der Expression detektiert (dGMean: unstimuliert:  $7,77 \pm 0,25$ ; 1 µM Dex:  $6,18 \pm 0,43$ ; 10 µM:  $6,26 \pm 0,25$ ; Abb. 37). Die Abnahme war nicht konzentrationsabhängig. Nach 48 und 72 h Inkubation der U937-Zellen mit Dex wurde ebenfalls eine signifikante Verringerung der Expression von membranständigen BAFF detektiert, wobei der Effekt mit 1 µM Dex etwas stärker war wie mit 10 µM (dGMean: unstimuliert 48 h:  $10,3 \pm 0,22$ ; 1 µM Dex:  $5,41 \pm 0,33$ ; 10 µM:  $6,01 \pm 0,37$ ; unstimuliert 72 h:  $8,14 \pm 0,59$ ; 1 µM Dex:  $5,67 \pm 0,18$ ; 10 µM Dex:  $6,13 \pm 0,2$ ; Abb. 37).





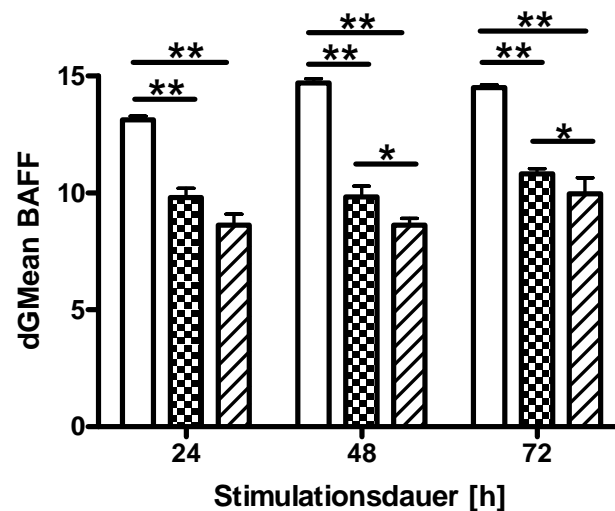
**Abb. 37: Herunterregulierung der membranständigen BAFF-Expression in Monozyten durch Dexamethason.**

U937-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit 1 und 10 µM Dex stimuliert (n = 3). Anschließend wurde die Expression des membranständigen BAFF durchflusszytometrisch gemessen. Verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß) wurde die Expression in Monozyten zu allen drei Zeitpunkten signifikant durch 1 (kariert) und 10 µM (liniert) Dex verringert. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken dargestellt. \* =  $p < 0,01$ ; \*\* =  $p < 0,001$

### 3.1.2 Dexamethason reguliert die Expression von intrazellulärem BAFF in Monozyten herunter

Zur Untersuchung der intrazellulären BAFF-Expression wurden U937-Zellen, wie unter 3.1.1 beschrieben, stimuliert.

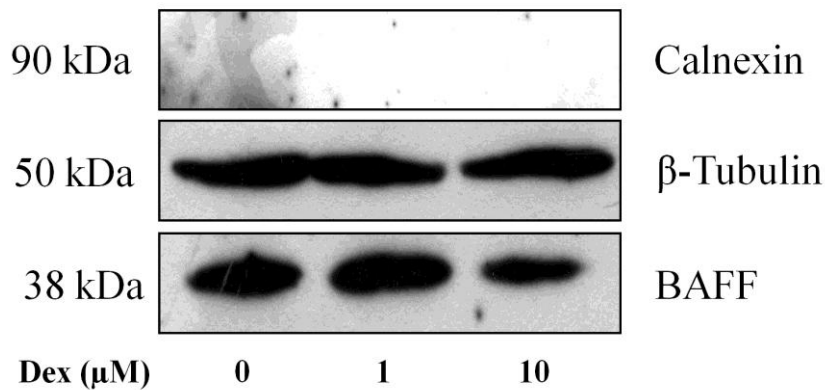
Nach allen drei untersuchten Zeiträumen wurde eine signifikante, konzentrationsabhängige Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression detektiert (dGMean: 24 h, unstimuliert:  $13,13 \pm 0,16$ ; 1 µM Dex:  $9,8 \pm 0,4$ ; 10 µM Dex:  $8,6 \pm 0,47$ ; 48 h, unstimuliert:  $14,71 \pm 0,9$ ; 1 µM Dex:  $9,83 \pm 0,47$ ; 10 µM Dex:  $8,61 \pm 0,3$ ; 72 h, unstimuliert:  $14,51 \pm 0,11$ ; 1 µM Dex:  $10,82 \pm 0,22$ ; 10 µM Dex:  $9,97 \pm 0,67$ ; Abb. 38).



**Abb. 38: Herabsetzung der Expression von intrazellulärem BAFF in Monozyten durch Dexamethason.**

U937-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit 1 (kariert) und 10 µM (liniert) Dex stimuliert (n = 3). Anschließend wurde die intrazelluläre BAFF-Expression mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Expression nahm nach allen drei Zeiträumen signifikant und konzentrationsabhängig ab verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß). Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken dargestellt. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,001$

Da bei einer Aufarbeitung der Zellen für eine durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären BAFF-Expression auch membranständige Moleküle markiert werden, wurde für den intrazellulären Nachweis zusätzlich die Western Blot-Analyse eingesetzt. Dazu wurden U937-Zellen für 12, 24, 48 und 72 h mit 1 und 10 µM Dex stimuliert und die zytoplasmatische Proteinfraction mittels SDS-PAGE aufgetrennt (50 µg Protein/Spur), auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und BAFF durch einen spezifischen Antikörper und Chemilumineszenz nachgewiesen. Als Referenzprotein für die zytoplasmatische Fraktion wurde  $\beta$ -Tubulin gewählt. Der Nachweis von Calnexin diente als Reinheitsnachweises der Fraktion. Wie unter Abb. 39 beispielhaft aus einem 24 h-Versuch dargestellt, ergab die Auswertung der Filme eine Verringerung der BAFF-Expression durch Dex. Diese Ergebnisse wurden in zwei weiteren unabhängigen Versuchen bestätigt.



**Abb. 39: Verringerung der membranständigen BAFF-Expression in Monozyten durch Dexamethason.**

U937-Zellen wurden für 24 h mit 1 und 10  $\mu\text{M}$  Dex stimuliert ( $n = 1$ ). Anschließend wurden die Proteine der zytoplasmatischen Fraktion in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das BAFF-Antigen mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Bei gleichmäßiger Beladung (50  $\mu\text{g}$ /Spur) wurde eine Abnahme der BAFF-Bande nach 24 h durch 10  $\mu\text{M}$  Dex detektiert.

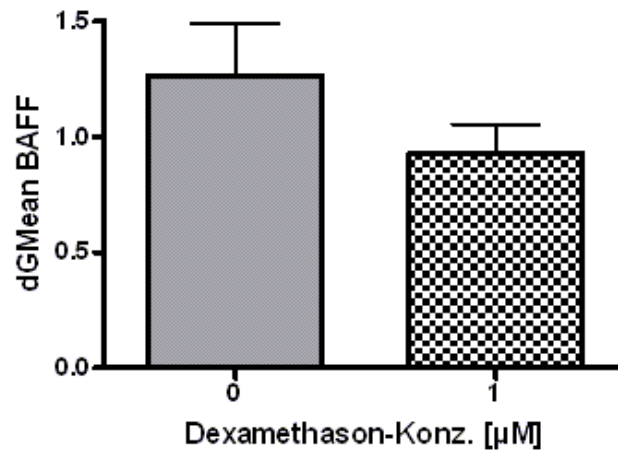
Somit konnten die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung bestätigt werden.

Zusammenfassend haben diese Versuche gezeigt, dass Dex die Expression von membranständigen als auch intrazellulären BAFF signifikant in U937-Zellen herunter reguliert.

### 3.1.3 Dexamethason reduziert die Expression von membrangebundenem BAFF in primären Monozyten

Um zu zeigen, dass die in dem Modell U937 erhaltenen Ergebnisse von physiologischer Bedeutung sind wurden Kulturen primärer Monozyten angelegt. Monozyten wurden dazu aus dem peripheren Blut gesunder Spender mittels positiver Selektion isoliert. Mehr als 98 % der Zellen waren positiv für CD14 (s. Ergebnisse, S. 74f). Am Tag nach der Isolierung wurden die Zellen mit 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS aktiviert und für 72 h mit 1  $\mu\text{M}$  Dex stimuliert. Da bei U937 kein konzentrationsabhängiger Effekt auf Ebene des membrangebundenen BAFF zu beobachten war (Abb. 37), wurde die niedrigere Dex-Konzentration für die Monozyten-Stimulation gewählt. Nach einer 72stündigen Inkubation wurde die Expression des membranständigen BAFF durchflusszytometrisch gemessen und analysiert.

In primären, LPS-aktivierten Monozyten führte 1  $\mu\text{M}$  Dex nach einer 72stündigen Inkubation zu einer nicht-signifikanten Verringerung der Expression von membranständigem BAFF (dGMean: unstimuliert:  $1,27 \pm 0,22$ ; 1  $\mu\text{M}$  Dex:  $0,93 \pm 0,13$ ; Abb. 40).



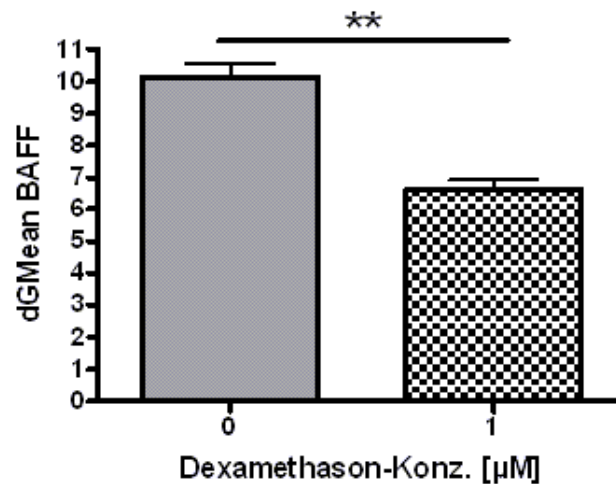
**Abb. 40: Verringerung der Expression von membranständigem BAFF in primären Monozyten durch Dexamethason.**

Primäre Monozyten wurden mit 1  $\mu\text{g/LPS}$  aktiviert (grau) und für 72 h mit 1  $\mu\text{M}$  Dex stimuliert ( $n = 3$ ). Die Expression des membranständigen BAFF wurde anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Dex reduzierte die Expression des membranständigen BAFF. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken dargestellt.  $p > 0,05$

### 3.1.4 Dexamethason reguliert die Expression von zytoplasmatischem BAFF in primären Monozyten herunter

Zur Untersuchung des Effekts von Dex auf die intrazelluläre BAFF-Expression wurden primäre Monozyten eine Tag nach ihrer Isolierung mit 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS aktiviert und mit 1  $\mu\text{M}$  Dex stimuliert.

Die 72stündige Inkubation der primären, LPS-aktivierten Monozyten mit 1  $\mu\text{M}$  Dex resultierte in einer signifikanten Herunterregulierung der BAFF-Expression (dGMean: unstimuliert:  $10,14 \pm 0,42$ ; 1  $\mu\text{M}$  Dex:  $6,62 \pm 0,3$ ; Abb. 41).



**Abb. 41: Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression durch Dexamethason in primären Monozyten.**

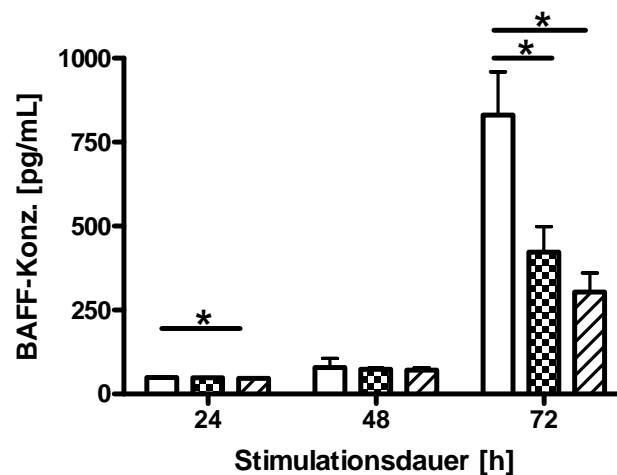
Primäre Monozyten wurden einen Tag nach ihrer Isolierung mit 1 µg/mL LPS (grau) aktiviert und mit 1 µM Dex (kariert) für 72 h stimuliert (n = 3). Die durchflusszytometrische Analyse ergab eine signifikanten Reduktion der Expression von intrazellulärem BAFF durch. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken dargestellt. \*\* =  $p < 0,005$

Zusammenfassend konnte mit diesen Resultaten gezeigt werden, dass 1 µM Dex ebenfalls in primärisolierten, LPS-aktivierten Monozyten einen herunter regulierenden Effekt auf die Expression des membranständigen und intrazellulären BAFF hat.

### 3.1.5 Dexamethason resultiert in einer Abnahme der BAFF-Freisetzung in Monozyten

Zur Untersuchung des Effekts von Dex auf die BAFF-Freisetzung in U937 wurden die Zellen für 24, 48 und 72 h mit 1 und 10 µM Dex stimuliert und anschließend die BAFF-Konzentration mittels ELISA in den Überständen gemessen.

Zu allen untersuchten Stimulationszeiträumen konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme von BAFF durch Dex detektiert werden (Abb. 42). Nach 24 und 48 h Inkubation mit 1 und 10 µM Dex war diese Tendenz bereits zu beobachten (BAFF-Konz. [pg/mL]: 24 h, unstimuliert:  $49,84 \pm 1,9$ ; 1 µM Dex:  $48,37 \pm 0,9$ ; 10 µM Dex:  $45,91 \pm 1$ ; 48 h, unstimuliert:  $78,9 \pm 27,71$ ; 1 µM Dex:  $74,13 \pm 3,14$ ; 10 µM Dex:  $71,32 \pm 6,67$ ). Die stärkste Abnahme des löslichen BAFF wurde in Überständen der 72 h-Kulturen detektiert (BAFF-Konz. [pg/mL]: unstimuliert:  $831,31 \pm 128,04$ ; 1 µM Dex:  $422,65 \pm 76,14$ ; 10 µM Dex:  $303,39 \pm 56,81$ ).



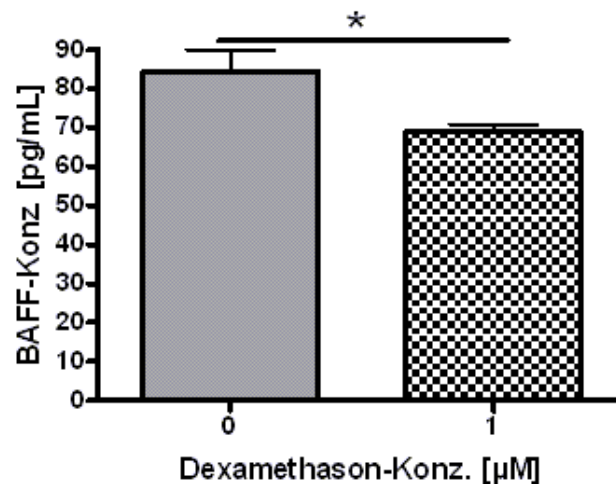
**Abb. 42: Herunterregulierung der Freisetzung von BAFF durch Dexamethason in Monozyten.**

U937-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit Konzentrationen 1 (kariert) und 10  $\mu$ M (liniert) Dex stimuliert ( $n = 3$ ). Anschließend wurde das von den Zellen freigesetzte BAFF in den Kulturüberständen mittels ELISA gemessen. Im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (weiß) resultierte Dex in einer konzentrationsabhängigen Abnahme der BAFF-Freisetzung nach allen drei Stimulationszeiträumen. Der stärkste Effekt war nach 72 h zu beobachten. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken angezeigt. \* =  $p < 0,01$  bzw. 0,05

### 3.1.6 Dexamethason verringert die BAFF-Freisetzung in primären Monozyten

Nachdem eine signifikante Reduktion der Konzentration an löslichem BAFF in den Kulturüberständen von U937-Zellen nach 72stündiger Inkubation mit Dex gezeigt werden konnte, wurde die Freisetzung in primärisolierten Monozyten untersucht. Dazu wurden die Zellen am Tag nach ihrer Isolierung mit 1  $\mu$ g/mL LPS aktiviert und für 72 h mit 1  $\mu$ M Dex stimuliert.

Die Freisetzung von BAFF in den Kulturüberstand der primärisolierten, LPS-aktivierten Monozyten nahm durch Dex signifikant ab (BAFF-Konz. [pg/mL]: unstimuliert:  $84,23 \pm 5,73$ ; 1  $\mu$ M Dex:  $68,74 \pm 2$ ;  $p = 0,0473$ ; Abb. 43).



**Abb. 43: Verringerung der BAFF-Freisetzung in prim. Monozyten durch Dexamethason.**

Primäre Monozyten wurden für 72 h mit LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) aktiviert (grau) und mit 1  $\mu\text{M}$  Dex (kariert) stimuliert ( $n = 3$ ). Bei der anschließenden Untersuchung der Kulturüberstände wurde eine signifikante Abnahme des sezernierten BAFF detektiert. Die dünnen Balken geben die Standardabweichung (SD) an. \* =  $p < 0,05$

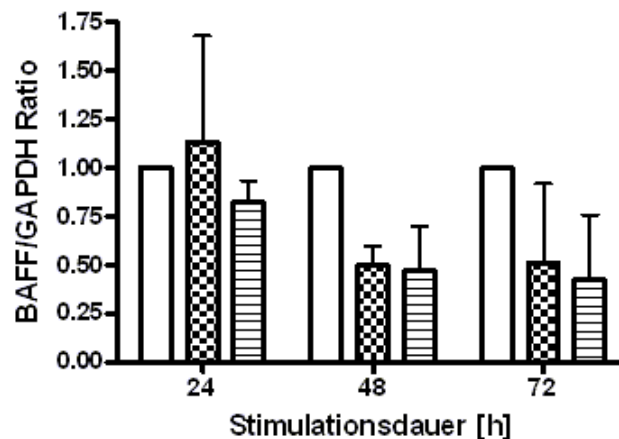
Zusammenfassend wurde mit diesen Ergebnissen gezeigt, dass die BAFF-Expression auf allen drei untersuchten Proteinebenen, membrangebunden, intrazellulär und Freisetzung, in U937-Zellen signifikant durch Dex herunter reguliert wurde. Diese Ergebnisse konnten in primär isolierten Monozyten mit 1  $\mu\text{M}$  Dex bestätigt werden. Alle weiteren Untersuchungen wurden daher ausschließlich in dem U937-Modell, da auch dann ein vergleichbarer Effekt anzunehmen war.

### 3.1.7 Dexamethason führt zu einer Herunterregulierung der BAFF-mRNA in Monozyten

Um zu ermitteln ob die Expressionsabnahme auf Proteinebene auf einer transkriptionalen oder einer post-transkriptionalen Regulierung beruht, wurde die BAFF-Expression auf mRNA-Ebene untersucht.

Nach der Stimulation von U937-Zellen für 24, 48 und 72 h wurde die mRNA aus den Zellen isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese wurde in die quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt und die BAFF/GAPDH Ratio für jede Probe ermittelt. Daraus konnten mittels relativer Quantifizierung die Unterschiede zwischen unstimulierten

und stimulierten Zellen auf mRNA-Ebene analysiert werden. Nach 24 h wurde die BAFF-mRNA durch 10  $\mu$ M Dex reduziert (BAFF/GAPDH Ratio: unstimuliert:  $1 \pm 0$ ; 1  $\mu$ M Dex:  $1,14 \pm 0,54$ ; 10  $\mu$ M Dex:  $0,82 \pm 0,11$ ; Abb. 44). Nach 48 h und 72 h führte die Inkubation der Zellen mit beiden Dex-Konzentrationen zu einer Abnahme der mRNA-Menge (BAFF/GAPDH Ratio: 48 h, unstimuliert:  $1 \pm 0$ ; 1  $\mu$ M Dex:  $0,5 \pm 0,01$ ; 10  $\mu$ M Dex:  $0,47 \pm 0,23$ ; 72 h, unstimuliert:  $1 \pm 0$ ; 1  $\mu$ M Dex:  $0,51 \pm 0,41$ ; 10  $\mu$ M Dex:  $0,42 \pm 0,34$ ; Abb. 44). Dieser Effekt war weder konzentrationsabhängig noch signifikant. Die in Abb. 44 dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus Duplikaten eines einzelnen Versuchs. Sie wurden in zwei weiteren Experimenten reproduziert.



**Abb. 44: Verringerung der BAFF-mRNA durch Dexamethason in Monozyten.**

U937-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit zwei verschiedenen Konzentrationen, 1 (kariert) und 10 (liniert)  $\mu$ M, Dex stimuliert ( $n = 2$ ). Anschließend wurde die Expression der mRNA mittels quantitativer Echtzeit-PCR gemessen und analysiert. 10  $\mu$ M Dex führte nach 24, 48 und 72 h zu einer Verringerung der BAFF-mRNA-Level verglichen mit unstimulierten (weiß) Zellen. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken dargestellt.  $p > 0,05$

## 3.2 Dexamethason im Vergleich mit anderen Corticoiden

### 3.2.1 Herunterregulierung der membranständigen BAFF-Expression in Monozyten ist unabhängig von dem Corticoid-Derivat

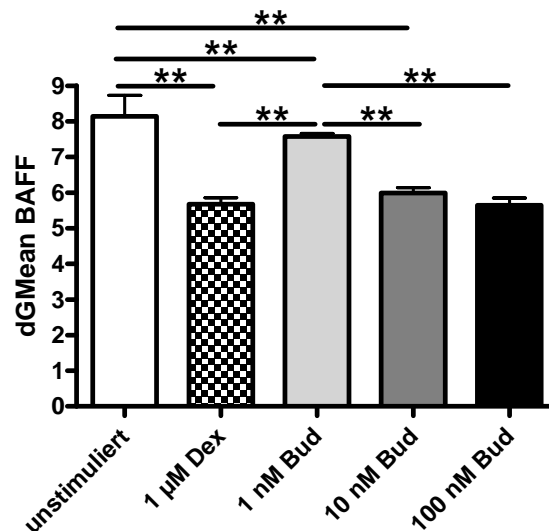
Um zu ermitteln, ob die bisherigen, mit Dex erhaltenen, Ergebnisse Wirkstoff-spezifisch sind, wurde Dex in zwei Versuchsreihen parallel mit Budesonid (Bud) und mit 6 $\alpha$ -Methylprednisolon (6 $\alpha$ -MP) zu den Zellen gegeben.



Zunächst wurden U937-Zellen für 72 h mit drei Konzentrationen Bud, 1, 10 und 100 nM inkubiert. Zum Vergleich wurden Zellen mit Dex (1  $\mu$ M) inkubiert.

Einerseits führte 100 nM Bud zu einem vergleichbar starken herunter regulierenden Effekt auf die Expression des membrangebundenen BAFF wie 1  $\mu$ M Dex (dGMean: unstimuliert:  $8,14 \pm 0,59$ ; 1  $\mu$ M Dex:  $5,67 \pm 0,18$ ; 100 nM Bud:  $5,65 \pm 0,2$ ; Abb. 45). Ausgehend von den eingesetzten Konzentrationen der beiden Wirkstoffe war die Wirksamkeit von Bud besser als von Dex, da nur ein 1/10tel benötigt wurde, um den gleichen Effekt zu erzielen.

Andererseits resultierte Bud in einer signifikanten und konzentrationsabhängigen Herunterregulierung der membrangebundenen BAFF-Expression (dGMean: unstimuliert:  $8,14 \pm 0,59$ ; 1 nM Bud:  $7,58 \pm 0,08$ ; 10 nM Bud:  $6 \pm 0,15$ ; 100 nM Bud:  $5,65 \pm 2$ ; Abb. 45).

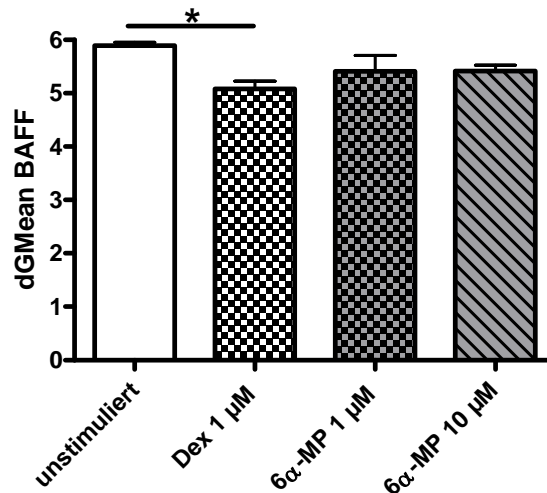


**Abb. 45: Herunterregulierung von membrangebundenen BAFF durch Budesonid vergleichbar mit Dexamethason in Monozyten.**

U937-Zellen wurden mit 1  $\mu$ M Dex (kariert) bzw. 1 (hellgrau), 10 (dunkelgrau) und 100 nM Bud (schwarz) für 72 h inkubiert ( $n = 3$ ). Anschließend wurde die Expression des membranständigen BAFF durchflusszytometrisch bestimmt. Bud regulierte die Expression konzentrationsabhängig herunter verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß). Der Effekt von 100 nM Bud war vergleichbar mit 1  $\mu$ M Dex. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken angegeben. \*\* =  $p < 0,001$

In einer weiteren Versuchsreihe zur Vergleichbarkeit von Dex mit anderen Corticoiden wurden U937-Zellen außer mit 1  $\mu$ M Dex auch mit 1 und 10  $\mu$ M 6 $\alpha$ -MP für 72 h stimuliert. 6 $\alpha$ -MP hatte keinen signifikanten Effekt auf die BAFF-Expression. Die herunter regulierende Wirkung von 1  $\mu$ M Dex war somit stärker als die von 6 $\alpha$ -MP (dGMean: unstimuliert:

$5,89 \pm 0,07$ ; 1  $\mu\text{M}$  Dex:  $5,08 \pm 0,15$ ; 1  $\mu\text{M}$  6 $\alpha$ -MP:  $5,41 \pm 0,3$ ; 10  $\mu\text{M}$  6 $\alpha$ -MP:  $5,42 \pm 0,11$ ; Abb. 46).



**Abb. 46: Herunterregulierung der membranständigen BAFF-Expression durch Dexamethason und 6 $\alpha$ -Methylprednisolon in Monozyten.**

Nach 72stündiger Stimulation von U937-Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Dex (kariert), 1  $\mu\text{M}$  (grau kariert) und 10  $\mu\text{M}$  (grau gestreift) 6 $\alpha$ -MP wurde die Expression des membrangebundenen BAFF durchflusszytometrisch detektiert ( $n = 3$ ). Verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß) zeigte 6 $\alpha$ -MP eine schwache Herunterregulierung der Expression und war damit schwächer als 1  $\mu\text{M}$  Dex. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken angegeben. \* =  $p < 0,01$

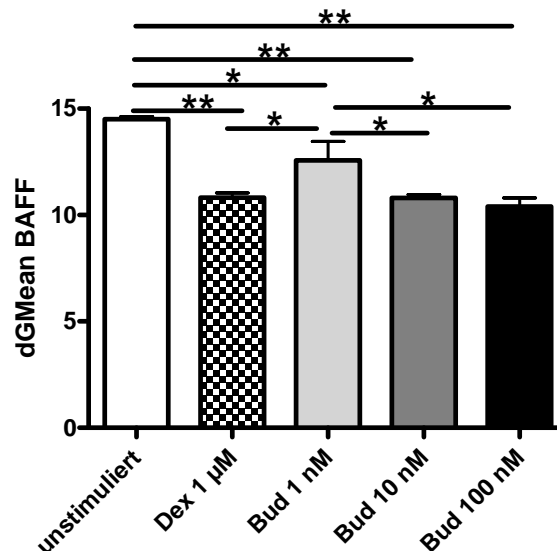
Zusammenfassend konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass unterschiedliche Substanzen aus der Gruppe der Corticosteroide unterschiedlich starke Effekte auf die membranständige Expression von BAFF in Monozyten ausüben. Dex und Bud waren in ihrer Wirkung vergleichbar. Die Wirkung von 6 $\alpha$ -MP war dagegen nicht signifikant.

### 3.2.2 Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten ist unabhängig von dem Corticoid-Derivat

Zur Untersuchung der Effekte von Bud und 6 $\alpha$ -MP auf die intrazelluläre BAFF-Expression wurden U937-Zellen für 72 h mit 1  $\mu\text{M}$  Dex und zunächst mit drei verschiedenen Konzentrationen von Bud, 1, 10 und 100 nM, stimuliert.

Auf der intrazellulären Ebene war der Effekt auf die BAFF-Expression mit 1 nM Bud signifikant schwächer als mit Dex, allerdings immer noch signifikant verglichen mit unstimulierten Zellen. 10 und 100 nM Bud zeigten eine mit 1  $\mu\text{M}$  Dex vergleichbare

Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression (dGMean: unstimuliert:  $14,51 \pm 0,11$ ; 1  $\mu\text{M}$  Dex:  $10,82 \pm 0,22$ ; 1 nM Bud:  $12,57 \pm 0,9$ ; 10 nM Bud:  $10,81 \pm 0,16$ ; 100 nM Bud:  $10,41 \pm 0,4$ ; Abb. 47).

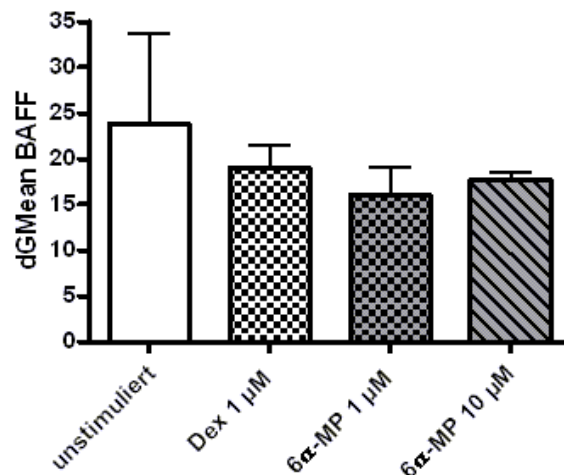


**Abb. 47: Runterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression in Monozyten durch Budesonid vergleichbar mit Dexamethason.**

U937-Zellen wurden für 72 h mit 1  $\mu\text{M}$  Dex (kariert) bzw. mit 1 (hellgrau), 10 (dunkelgrau) und 100 nM Bud (schwarz) inkubiert. Anschließend wurde die intrazelluläre BAFF-Expression in den Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Herabsetzung der Expression war mit 10 und 100 nM Bud vergleichbar stark wie mit 1  $\mu\text{M}$  Dex. 1 nM Bud regulierte die Expression im Vergleich zu unstimulierten Zellen (weiß) auch herunter, jedoch schwächer wie mit den höheren Bud-Konzentrationen und Dex. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken angezeigt. \* =  $p < 0,01$ ; \*\* =  $p < 0,001$

In einem weiteren Versuch wurden Zellen der Linie U937 mit 1  $\mu\text{M}$  Dex und mit zwei Konzentrationen 6 $\alpha$ -MP, 1 und 10  $\mu\text{M}$ , für 72 h stimuliert.

Beide 6 $\alpha$ -MP-Konzentrationen führten zu einer leichten, nicht signifikanten Herabsetzung der intrazellulären BAFF-Expression in U937 führten. Diese Expressionsverringerungen waren etwas stärker als mit 1  $\mu\text{M}$  Dex (dGMean: unstimuliert:  $23,75 \pm 10$ ; 1  $\mu\text{M}$  Dex:  $19 \pm 2,45$ ; 1  $\mu\text{M}$  6 $\alpha$ -MP:  $16 \pm 3,17$ ; 1  $\mu\text{M}$  6 $\alpha$ -MP:  $17,73 \pm 0,82$ ; Abb. 48).



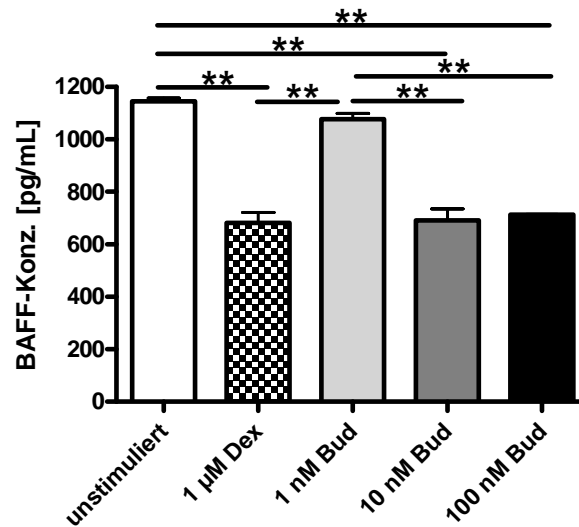
**Abb. 48: Herabsetzung der intrazellulären BAFF-Expression durch 6α-Methylprednisolon vergleichbar mit Dexamethason in Monozyten.**

U937-Zellen wurden für 72 h mit 1 µM Dex (kariert) bzw. mit 1 (grau kariert) und 10 µM (grau gestreift) 6α-MP stimuliert. Die anschließende Messung der intrazellulären BAFF-Expression mittels Durchflusszytometer ergab eine schwache Herabsetzung bei beiden Corticoid-Derivaten, mit allen eingesetzten Konzentrationen. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken dargestellt.  $p > 0,05$

Zusammenfassend konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass auch andere Corticoide wie Bud und 6α-MP eine Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression vergleichbar mit Dex in U937-Zellen nach 72stündiger Inkubation zur Folge haben.

### 3.2.3 Herunterregulierung der Freisetzung von BAFF in Monozyten ist unabhängig von dem Corticoid-Derivat

Untersuchungen auf Ebene der BAFF-Freisetzung nach 72stündiger Stimulation von U937-Zellen mit 1 µM Dex bzw. drei verschiedenen Konzentrationen von Budesonid, 1, 10 und 100 nM, zeigten eine konzentrationsabhängigen Abnahme des löslichen BAFF durch Bud. Bei den beiden höheren 10 und 100 nM Bud war diese Reduktion signifikant. Des weiteren war sie vergleichbar mit der Intensität der durch 1 µM Dex-verursachten Verringerung des löslichen BAFF (BAFF-Konz. [pg/mL]: unstimuliert:  $1146 \pm 12,02$ ; 1 µM Dex:  $681,1 \pm 40,45$ ; 1 nM Bud:  $1078 \pm 21,64$ ; 10 nM Bud:  $692 \pm 43,35$ ; 100 nM Bud:  $712,1 \pm 2,48$ ; Abb. 49).

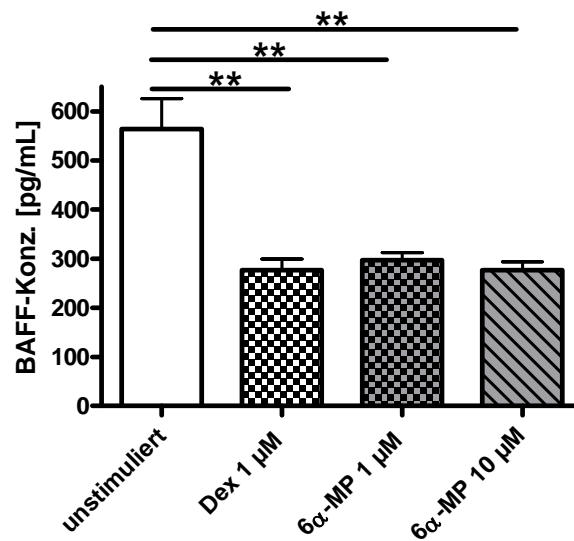


**Abb. 49: Herunterregulierung der BAFF Freisetzung in Monozyten durch Budesonid vergleichbar mit Dexamethason.**

U937-Zellen wurden 72 h mit 1 µM Dex (kariert) bzw. mit drei verschiedenen Konzentrationen Bud, 1 (hellgrau), 10 (dunkelgrau) und 100 nM (schwarz), stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von löslichem BAFF in den Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. 1 µM Dex sowie 10 und 100 nM Bud führten zu einer signifikanten, fast identischen Verringerung der BAFF-Konzentration in den Überständen. 1 nM Bud hatte kaum eine Reduzierung des löslichen BAFF zur Folge, verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß). Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken eingezeichnet. \*\* =  $p < 0,001$

In einem weiteren Versuchsansatz wurden U937-Zellen mit 1 µM Dex bzw. zwei verschiedenen Konzentrationen 6α-MP, 1 µM und 10 µM, für einen Zeitraum von 72 h stimuliert.

1 µM Dex führte ebenso wie beide 6α-MP-Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der BAFF-Freisetzung in den Kulturüberständen. Die detektierten Konzentrationen bei 6α-MP-Stimulation waren vergleichbar mit der Dex-Stimulation. Eine Konzentrationsabhängigkeit zwischen den beiden 6α-MP-Konzentrationen war kaum zu detektieren (BAFF-Konz. [pg/mL]: unstimuliert:  $563,9 \pm 61,95$ ; 1 µM Dex:  $276,3 \pm 23,23$ ; 1 µM 6α-MP:  $297,3 \pm 15,05$ ; 10 µM 6α-MP:  $276,8 \pm 17,03$ ; Abb. 50).



**Abb. 50: Verringerung der BAFF-Freisetzung durch Dexamethason und 6α-Methylprednisolon in Monozyten.**

U937-Zellen wurden 72 h mit 1 µM Dex (kariert) bzw. 1 (grau kariert) und 10 µM (grau gestreift) 6α-MP stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von löslichem BAFF in den Kulturüberständen dieser Zellen mittels ELISA gemessen. Dex führte wie auch beide 6α-MP-Konzentrationen zu einer Herunterregulierung der BAFF-Freisetzung verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß). Diese Herunterregulierung war für Dex ähnlich stark wie für die beiden 6α-MP-Konzentrationen. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken dargestellt. \*\* =  $p < 0,001$

Zusammenfassend haben diese Versuche gezeigt, dass auch andere Corticosteroid, z. B. Bud und 6α-MP, zu einer Herunterregulierung der intrazellulären und membrangebundenen BAFF-Expression sowie dessen Freisetzung in Monozyten führte. Die beobachteten Effekte dieser beiden Corticosteroide waren auf allen untersuchten Proteinebenen bei mindestens einer angewendeten Konzentration mit Dex vergleichbar.

### 3.3 Dexamethason und sein Antagonist RU486

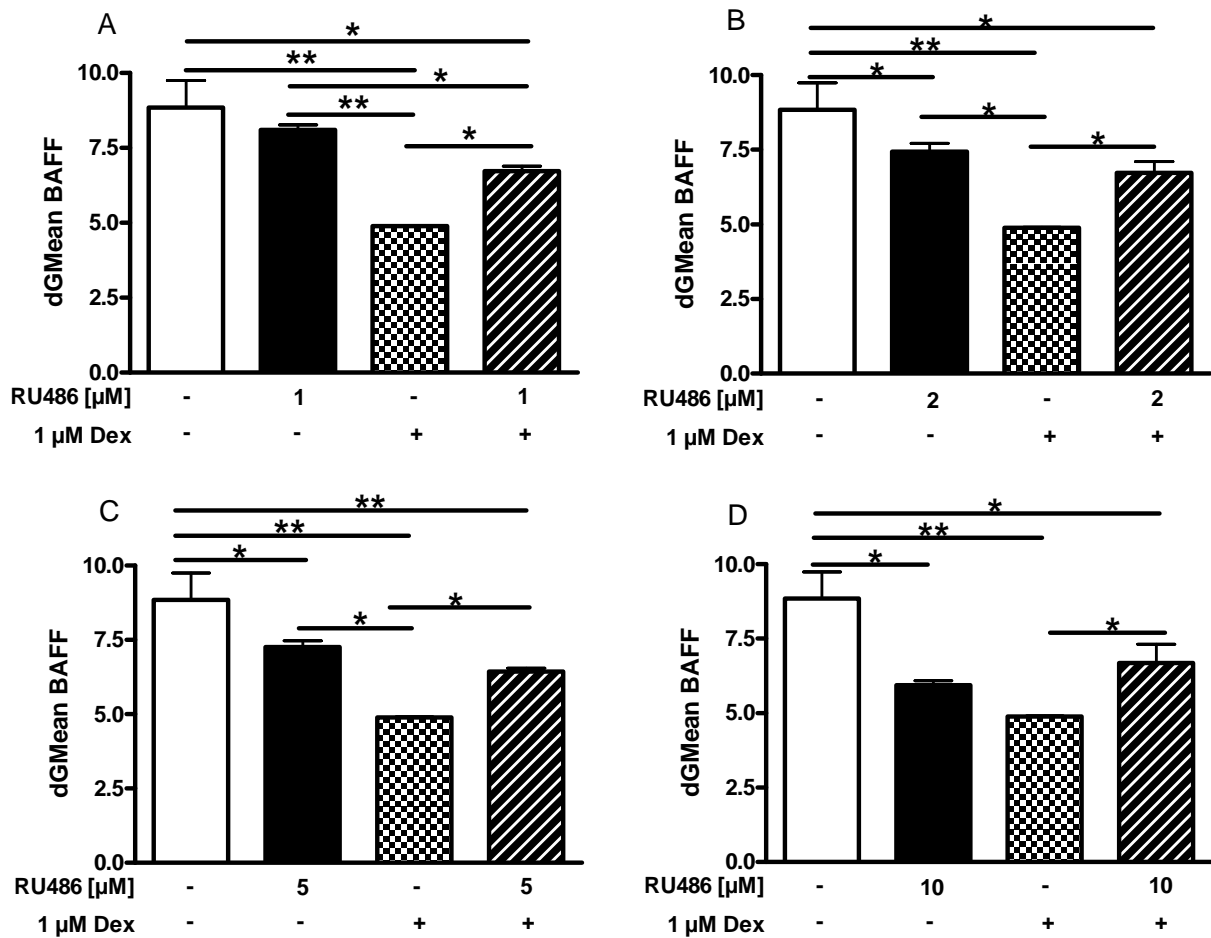
#### 3.3.1 Herunterregulierung der membranständigen BAFF-Expression durch Dexamethason lässt sich mit RU486 blockieren

Bei dem synthetischen Corticosteroid Mifepriston (RU486) handelt es sich um einen Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten (Gagne et al. 1985), der die Wirkung anderer Corticosteroide wie Dex hemmen kann. Daher wird Mifepriston auch als Antigluocorticoid

bezeichnet. Er bindet im Glucocorticoidrezeptor an die gleiche Stelle wie Dex, allerdings mit einer deutlich höheren Affinität (Gagne et al. 1986).

Um zu untersuchen ob RU486 auch in dem hiesigen Modell eine Blockierung des Effekts von Dex zur Folge hat, wurden U937-Zellen mit 1  $\mu$ M Dex und gleichzeitig mit verschiedenen Konzentrationen von RU486, 1, 2, 5 und 10  $\mu$ M, für 72 h stimuliert.

Verglichen mit unstimulierten Zellen war für 1  $\mu$ M RU486 kaum eine Veränderung der Expression zu detektieren. Die durch Dex herunter regulierte Expression von BAFF wurde durch die gleichzeitige Gabe von 1  $\mu$ M RU486 fast vollständig aufgehoben. (dGMean: unstimuliert:  $8,84 \pm 0,9$ ; 1  $\mu$ M RU486:  $8,09 \pm 0,17$ ; 1  $\mu$ M Dex:  $4,89 \pm 0,02$ ; 1  $\mu$ M RU486 + 1  $\mu$ M Dex:  $6,72 \pm 0,16$ ; Abb. 51 A). Dieser Effekt wurde ebenfalls für die 2-fache, 5-fache und 10-fache Konzentration von RU486 gegenüber Dex beobachtet. In Abb. 51 B sind die Ergebnisse des Versuchs mit 2  $\mu$ M RU486 (dGMean: unstimuliert:  $8,84 \pm 0,9$ ; 2  $\mu$ M RU486:  $7,44 \pm 0,29$ ; 1  $\mu$ M Dex:  $4,89 \pm 0,02$ ; 2  $\mu$ M RU486 + 1  $\mu$ M Dex:  $6,73 \pm 0,37$ ), in Abb. 51 C mit 5  $\mu$ M (dGMean: unstimuliert:  $8,84 \pm 0,9$ ; 5  $\mu$ M RU486:  $7,25 \pm 0,21$ ; 1  $\mu$ M Dex:  $4,89 \pm 0,02$ ; 5  $\mu$ M RU486 + 1  $\mu$ M Dex:  $6,44 \pm 0,11$ ) und in Abb. 51 D mit 10  $\mu$ M RU486 dargestellt (dGMean: unstimuliert:  $8,84 \pm 0,9$ ; 10  $\mu$ M RU486:  $5,93 \pm 0,15$ ; 1  $\mu$ M Dex:  $4,89 \pm 0,02$ ; 10  $\mu$ M RU486 + 1  $\mu$ M Dex:  $6,73 \pm 0,37$ ). Das basale Expressionslevel wie in unstimulierten Zellen konnte allerdings durch die Costimulationen nicht erreicht werden. Auch RU486 führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Expression.



**Abb. 51: Aufhebung der Herunterregulierung der membrangebundenen BAFF-Expression durch RU486.**

U937-Zellen wurden 72 h mit verschiedenen RU486-Konzentrationen (schwarz), 1  $\mu$ M Dex (kariert) und mit beiden zusammen (gestreift) stimuliert ( $n = 3$ ). Die anschließende durchflusszytometrische Analyse der Expression von membranständigem BAFF ergab, dass alle getesteten RU486-Konzentrationen, (A) 1, (B) 2, (C) 5 und (D) 10  $\mu$ M, zu einer Anhebung der durch Dex herunterregulierten Expression führten. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken angegeben. \* =  $p < 0,01$  bzw. 0,05; \*\* =  $p < 0,001$

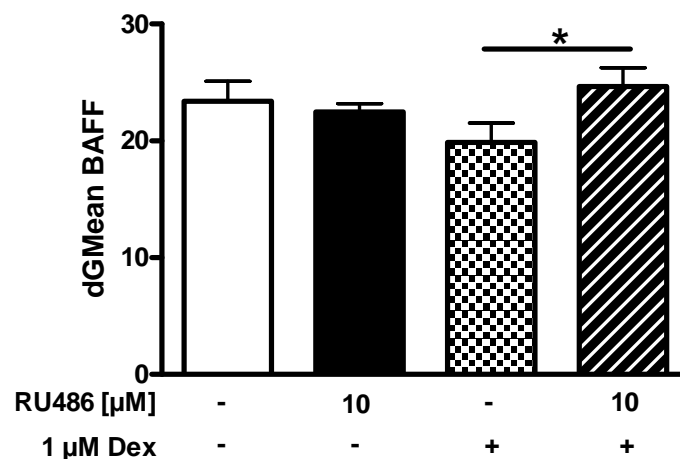
Zusammenfassend konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass RU486 in dem für diese Arbeit verwendeten Modell in der Lage ist, die durch Dex verursachte Reduktion der membrangebundenen BAFF-Expression signifikant anzuheben.



### 3.3.2 Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression durch Dexamethason lässt sich mit RU486 blockieren

Nachdem auf der Ebene des membranständigen BAFF eine Anhebung der Herunterregulierung durch RU486 detektiert worden war, wurde dieser Effekt als nächstes auf der intrazellulären Expressionsebene untersucht. Dazu wurden Zellen der Linie U937, wie unter 3.3.1 beschrieben, stimuliert.

Eine Aufhebung der Herunterregulierung von intrazellulärem BAFF war bei Zellen zu detektieren, die mit der 10fachen Konzentration (10  $\mu$ M) RU486 costimuliert wurden (dGMean: unstimuliert:  $23,39 \pm 1,72$ ; 10  $\mu$ M RU486:  $22,47 \pm 0,71$ ; 1  $\mu$ M Dex:  $19,86 \pm 1,67$ ; 10  $\mu$ M RU486 + 1  $\mu$ M Dex:  $24,66 \pm 1,6$ ; Abb. 52). Die niedrigeren RU486-Konzentrationen, 1, 2 und 5  $\mu$ M, verursachten keinen signifikante Anstieg der Expression, die Tendenz zur Aufhebung der Herunterregulierung war allerdings bereits erkennbar (nicht gezeigt).



**Abb. 52: Aufhebung der Dexamethason-vermittelten Herunterregulierung der intrazellulären BAFF-Expression durch RU486.**

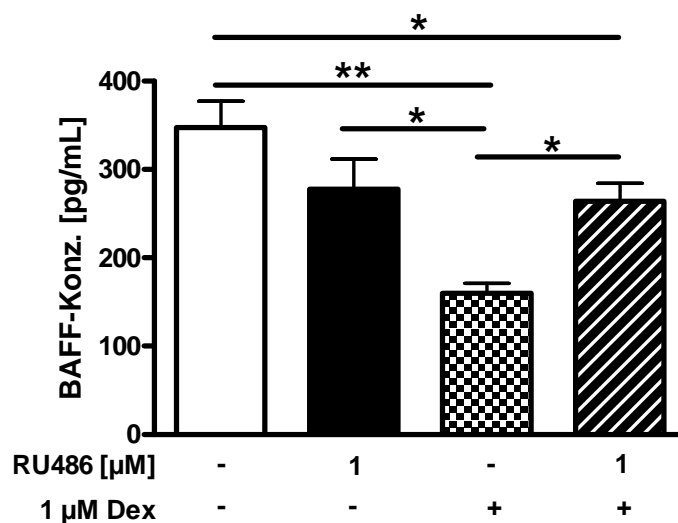
U937-Zellen wurden 72 h mit 1  $\mu$ M Dex und zeitgleich mit 10  $\mu$ M RU486 stimuliert ( $n = 3$ ). Anschließend wurde die Expression des intrazellulären BAFF durchflusszytometrisch ermittelt. Verglichen mit unstimulierten Zellen (weiß) hatte 10  $\mu$ M RU486 (schwarz) kaum einen Effekt auf die Expression der Zellen. 1  $\mu$ M Dex allein (kariert) führte zu einer Herunterregulierung der Expression, die durch Costimulation mit 10  $\mu$ M RU486 (gestreift) vollständig aufgehoben wurde. Die Standardabweichungen (SD) sind durch kleine Balken dargestellt. \* =  $p < 0,05$

Die Versuche auf der intrazellulären Ebene bestätigten die Daten der membrangebundenen Ebene bezüglich der Aufhebung der Dex-vermittelten Herunterregulierung von BAFF durch RU486. Allerdings konnte intrazellulär nur eine 10-fach höhere Konzentration von RU486 zu einem signifikanten Effekt führen.

### 3.3.3 Die Dexamethason-vermittelte Herunterregulierung der BAFF-Freisetzung lässt sich mit RU486 blockieren

Zur Untersuchung der Effekte auf die Sekretion von BAFF wurden U937-Zellen in einer 72stündigen Inkubation mit 1  $\mu$ M Dex und mit verschiedenen RU486-Konzentrationen, 1, 2, 5 und 10  $\mu$ M, stimuliert und anschließend die Kulturüberstände mittels ELISA gemessen.

Die Costimulation von U937-Zellen für 72 h führte bei äquimolaren Konzentrationen (1  $\mu$ M) von Dex und RU486 zu einer signifikanten Aufhebung der durch Dex verringerten Freisetzung von BAFF (BAFF-Konz. [pg/mL]: unstimuliert:  $347,5 \pm 29,76$ ; 1  $\mu$ M RU486:  $277,9 \pm 34$ ; 1  $\mu$ M Dex:  $160 \pm 11,05$ ; 1  $\mu$ M RU486 + 1  $\mu$ M Dex:  $264,1 \pm 20,47$ ; Abb. 53). Das basale BAFF-Level der unstimulierten Zellen wurde allerdings nicht erreicht. Die höheren RU486-Konzentrationen, 2, 5 und 10  $\mu$ M, zeigten aber keine signifikante Veränderung der BAFF-Freisetzung durch die Costimulation verglichen mit Zellen, die nur Dex behandelt wurden. Die Tendenz zur Aufhebung des Dex-vermittelten Effekts war allerdings zu sehen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 53: Aufhebung der Dexamethason-verursachten Herunterregulierung der BAFF-Freisetzung durch RU486.**

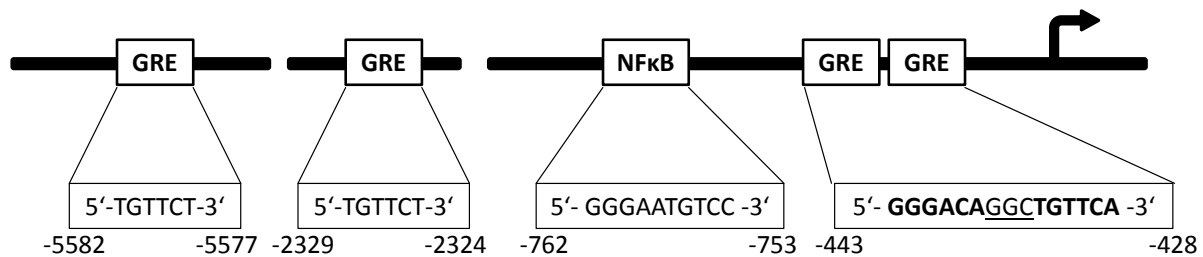
U937-Zellen wurden für 72 h mit 1  $\mu$ M Dex und 1  $\mu$ M RU486 stimuliert. Anschließend wurde in den Kulturüberständen das freigesetzte, lösliche BAFF mittels ELISA gemessen ( $n = 3$ ). Die durch Dex-verursachte Verringerung der BAFF-Freisetzung (kariert) wurde teilweise durch die Costimulation der Zellen mit 1  $\mu$ M RU486 (gestreift) aufgehoben. 1  $\mu$ M RU486 alleine (schwarz) führte im Vergleich zu unstimulierten Zellen (weiß) ebenfalls zu einer schwachen Reduktion der BAFF-Freisetzung. Die Standardabweichungen (SD) sind als kleine Balken dargestellt. \* =  $p < 0,01$  bzw. 0,05; \*\* =  $p < 0,001$

Zusammengefasst haben diese Experimente gezeigt, dass die durch Dex verursachte Herunterregulierung der BAFF-Expression und Freisetzung signifikant durch die Gabe des Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten RU486 angehoben wird. Allerdings konnte das basale Level wie in unstimulierten Zellen nicht vollständig erreicht werden.

### **3.4 Untersuchung der genomischen Effekte von Dexamethason**

#### **3.4.1 Promoterregion des BAFF-Gens enthält hypothetische Glucocorticoid-Rezeptor-Antwort-Bindeelement**

Um zu untersuchen, ob BAFF als Gen-Kandidat für eine direkte Genregulation von dem Glucocorticoidrezeptor (GR) in Frage kommt, wurde seine Promoter-Sequenz (Accession No.: 10996) mit Hilfe des Online-Programms „Promoter Database“ auf potentielle GRE hin untersucht. Dazu wurde in einem DNA-Bereich des Promoters von -6000 bis +400 bp nach GREs mittels der Suchfunktion gesucht. Einfache GRE die dem Muster 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3' folgen, konnten dabei nicht gefunden werden. Allerdings ist vor allem in der 5'-Hälfte ein hoher Grad an Flexibilität bereits bekannt, wie bei dem Gen des  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors gezeigt wurde (Cornett et al., 1998). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache konnte ein potentielles GRE in der Promoter-Sequenz des humanen BAFF-Gens an Position -443 bis -428 gefunden werden wie in Abb. 54 dargestellt ist. Des weiteren wurden mehrere halbe GRE mit der Sequenz TGTTCT an den Positionen -5582 bis -5577, -2329 bis -2324 und -1390 bis -1385 identifiziert. Darüber hinaus beinhaltet die Promoterregion von BAFF an Position -762 bis -753 eine Konsensussequenz für NF $\kappa$ B, ein Transkriptionsfaktor der als Regulator des BAFF-Gens bereits bekannt ist (Fu et al. 2006).



**Abb. 54: Potentielle *glucocorticoid response elements* (GREs) in der Promoter-Sequenz von BAFF identifiziert.**

Mittels *in silico* Sequenz-Analysen wurden zwei halbe und ein vollständiges GRE in der Promotor-Region des BAFF-Gens identifiziert. Das vollständige GRE befindet sich an Position -443 bis -428, zwischen Transkriptionsstart und der Konsensussequenz für NFκB (Position -762 bis -753).

### 3.4.2 Glucocorticoidrezeptor $\alpha$ -Einwanderung in den Kern von U937-Zellen ist nicht nachweisbar

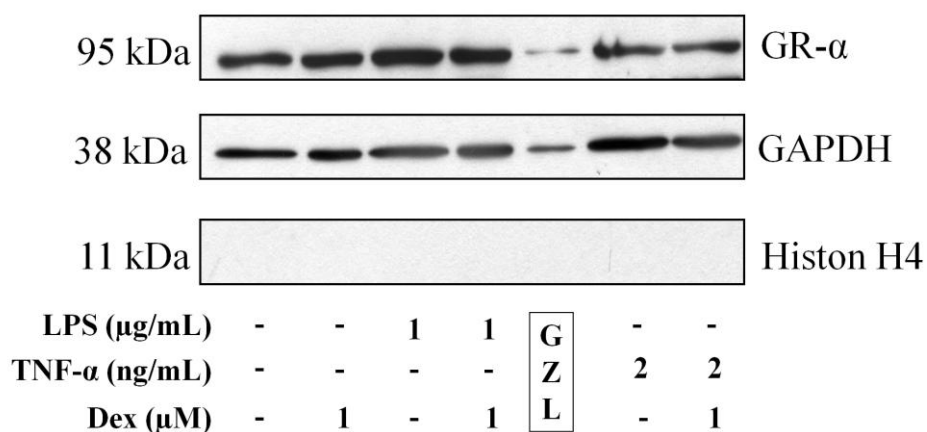
Nachdem gezeigt werden konnte, dass im Promoter des BAFF-Gens hypothetische GREs codiert sind, wurde als nächstes untersucht, ob der GR nach erfolgter Ligandenbindung in den Nukleus transloziert um an eines der GRE zu binden. Dabei wurde auf die dominante  $\alpha$ -Isoform des Rezeptors fokussiert, die im Zytoplasma lokalisiert ist und nach erfolgter Ligandenbindung in den Kern transloziert.

Zunächst wurden U937-Zellen für 30 min mit 1  $\mu$ g/mL LPS oder mit 2 ng/mL TNF- $\alpha$  vorinkubiert und anschließend für weitere 2 h zusätzlich mit 1  $\mu$ M Dex stimuliert. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Zellen geerntet und die Proteine isoliert. Dabei wurde die zytoplasmatische von der nukleären Fraktion separiert (s. Methoden, S. 41f). Anschließend wurden die Proteine (50  $\mu$ g/Spur) mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Nach darauffolgender Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran GR- $\alpha$  mittels Antikörper und Chemilumineszenz nachgewiesen. Zur Überprüfung der Fraktionsreinheit wurden zusätzlich die Nachweise des Histon H4- und das GAPDH-Antigens durchgeführt. Ersteres ist ein Marker für die nukleäre, letzteres für die zytoplasmatische Proteinfraction. Auf den beiden dargestellten Gelen wurde zusätzlich jeweils eine Spur mit 50  $\mu$ g Protein aus einem Gesamtzellextrakt geladen.

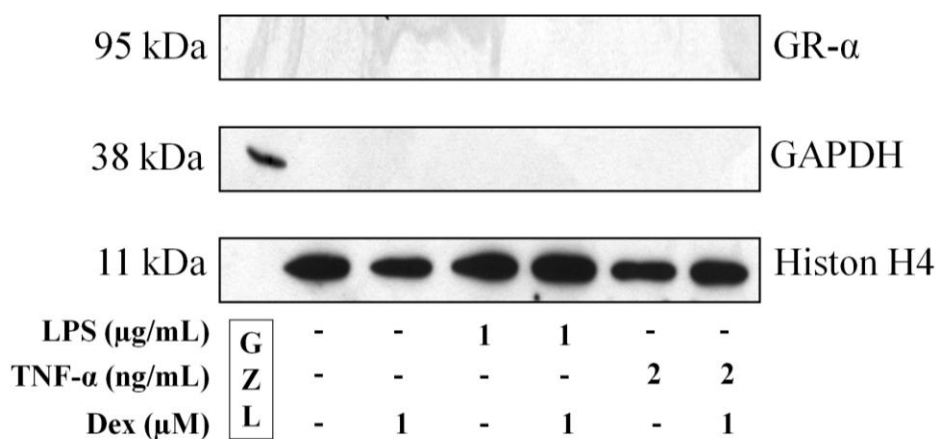
Das GR- $\alpha$ -Antigen war in allen zytoplasmatischen Extrakten nachweisbar (Abb. 55 A). LPS führte zu einer Hochregulierung der GR- $\alpha$ -Expression verglichen mit unstimulierten Zellen. TNF- $\alpha$  wirkte sich herunter regulierend auf die Expression von GR- $\alpha$  aus. Die Zugabe von Dex hatte nur bei den mit 1x PBS präinkubierten Zellen eine verstärkte GR- $\alpha$ -Expression zur

Folge. Bei den LPS und TNF- $\alpha$ -präinkubierten Zellen hatte die Zugabe von Dex keinen Einfluss auf die GR- $\alpha$ -Expression, verglichen mit den jeweiligen DMSO-behandelten Zellen. GAPDH diente als interner Beladungsstandard. Histon H4 war in keiner der zytoplasmatischen Proben nachweisbar. Wie in Abb. 55 B dargestellt ist, konnte GR- $\alpha$  nicht in den nukleären Fraktionen nachgewiesen werden. GAPDH war in diesen Fraktionen entsprechend der Erwartung ebenfalls nicht zu detektieren. Nach längeren Stimulationszeiträumen von 4 und 8 h war ebenfalls keine Translokation von GR- $\alpha$  detektiert worden (Daten nicht gezeigt). Die exemplarisch in Abb. 55 dargestellten Blots wurden in zwei weiteren unabhängigen Versuchen bestätigt.

A



B



**Abb. 55: Dexamethason hat keine Einwanderung von GR- $\alpha$  in den Zellkern zur Folge.**

U937-Zellen wurden nach einer 30minütigen Präinkubation mit LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) oder TNF- $\alpha$  (2 ng/mL) für 2 h mit 1  $\mu\text{M}$  Dex stimuliert. Anschließend wurde die zytoplasmatische von der nukleären Proteinfraction separiert. Die Antigene wurden nach der Auftrennung mit einer SDS-PAGE (50  $\mu\text{g/Spur}$ ) mittels Western Blot auf einer Nitrozellulose-Membran nachgewiesen. (A) GR- $\alpha$  wurde in allen zytoplasmatischen Fraktionen nachgewiesen. Die Expression wurde durch LPS gesteigert. Bei Dex-stimulierten Zellen wurde zusätzlich ein Antigen mit 90 kDa detektiert. Histon H4 wurde nicht detektiert. (B) GR- $\alpha$  konnten in nukleären Fraktionen nicht nachgewiesen werden. Eine Kontamination mit GAPDH war ebenso wenig detektierbar.

Zusammenfassend konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -Isoform des GR unter den untersuchten Bedingungen nicht in den Kern einwandert.

In einem abschließenden Fazit dieses Versuchskomplexes können folgende Erkenntnisse zusammengefasst werden: Dex resultiert in einer Herunterregulierung der BAFF-Expression auf membrangebundener und intrazellulärer Ebene in U937-Zellen. Die Freisetzung von löslichem BAFF an das umgebene Medium ist ebenfalls verringert. Diese Resultate konnten in Primärkulturen von Monozyten bestätigt werden. Analysen der mRNA zeigten ebenfalls eine Verringerung der BAFF-Expression durch Dex (Tab. 5). Auch andere Glucocorticoide wie Bud und 6 $\alpha$ -MP sind in der Lage die BAFF-Expression auf allen drei untersuchten Proteinebenen zu verringern. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass der Dex-vermittelte negative Effekt auf die BAFF-Expression durch den Antagonist RU486 signifikant antagonisiert wird. Bezüglich des molekularen Mechanismus wurden in der Promoter-Sequenz des BAFF-Gens mehrere hypothetischen Bindeelemente für GR (GRE) identifiziert. Allerdings konnte keine Einwanderung von GR- $\alpha$  in den Kern detektiert werden.

**Tab. 5: Übersicht der Resultate aus Schlüsselexperimenten mit Dex**

Zellen	Expressions- level	Stimulations- dauer [h]	Stimulus	Wert	Abnahme [%]
U937	Protein (Membran)	72	Ø	8,1	-
			Dex, 1 µM	5,7	30,3
			Dex, 10 µM	6,1	24,7
	[dGMean]				
	Protein (Zytoplasma)	72	Ø	14,5	-
			Dex, 1 µM	10,8	25,4
			Dex, 10 µM	10	31,3
	[dGMean]				
	Freisetzung  (BAFF-Konz. [pg/mL])	72	Ø	831,3	-
			Dex, 1 µM	422,6	49,2
			Dex, 10 µM	303,4	63,5
	mRNA  (BAFF/GAPDH Ratio)	24	Ø	1	-
			Dex, 1 µM	0,51	49
			Dex, 10 µM	0,42	58
Prim. Monozyten	Protein (Membran)	72	LPS + Ø	1,3	-
			LPS + Dex, 1 µM	0,9	26,8
	[dGMean]				
	Protein (Zytoplasma)	72	LPS + Ø	10,14	-
			LPS + Dex, 1 µM	6,6	34,7
	[dGMean]				
Freisetzung  (BAFF-Konz. [pg/mL])	72	LPS + Ø	84,2	-	
		LPS + Dex, 1 µM	68,7	18,4	

## VIII Diskussion

Autoimmunerkrankungen sind in der Neurologie weit verbreitet. Während anfangs die Entdeckung von Autoantikörpern oder das Ansprechen auf Immuntherapie oft der erste Hinweis auf das Vorliegen einer Autoimmunerkrankung war, fokussierte sich die wissenschaftliche Arbeit in erster Linie auf autoreaktive T-Lymphozyten bei den entsprechenden Erkrankungen. Der Beitrag der B-Zellen zu diesen Erkrankungen wurde als Konsequenz der T-Zell-Dysfunktion angesehen. Eine Vielzahl von Arbeiten hat inzwischen jedoch gezeigt, dass bei einem Teil der neuroimmunologischen Erkrankungen auch B-Zellen eine wichtige Rolle bei Krankheits-Entwicklung und -Verlauf spielen. Dabei kommt ihnen vor allem als Antikörper- bzw. Autoantikörper-produzierende Zellen, aber auch als Zytokinproduzenten und Antigen- bzw. Autoantigen-präsentierende Zellen große Bedeutung zu. Eine Beeinflussung der B-Zellfunktion und -Homöostase scheint sich als vielversprechender Angriffspunkt bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen zu bestätigen, beispielsweise durch die erfolgreiche Behandlung von Rheumatoider Arthritis mit *Rituximab*®, einem chimären anti-CD20-Antikörper, der zu einer Depletion von CD20<sup>+</sup>-Zellen führt (Smith 2003; Cohen 2005; Browning 2006; Teng et al. 2007).

Ein wichtiger Faktor in diesem Zusammenhang ist der B-Zell-aktivierende Faktor BAFF. Seit seiner Entdeckung Ende der 1990er (Moore et al. 1999; Mukhopadhyay et al. 1999; Schneider et al. 1999) hat dieses Mitglied der TNF-Familie aufgrund seiner Schlüsselrolle bei Überleben, Differenzierung und Immunglobulinsekretion der B-Zellen großes Interesse auf sich gezogen. Zum einen führt eine Überexpression von BAFF nachweislich zur Ausbildung von autoimmunen Krankheitsbildern in Mäusen (Groom et al. 2002; Mackay et al. 2005; Mackay und Leung 2006; Groom et al. 2007). Zum anderen wurden mittlerweile bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen erhöhte BAFF-Serumlevel beschrieben, so zum Beispiel bei Rheumatoider Arthritis (RA), Sjögrens Syndrom (SS), Multipler Sklerose (MS) und Systemischen Lupus erythematodes (SLE) (Cheema et al. 2001; Zhang et al. 2001; Groom et al. 2002; Stohl 2004; Krumbholz et al. 2005; Stohl 2005; Ittah et al. 2006). Immunmodulatoren wie Lipopolysaccharid (LPS) und IFN- $\gamma$  (IFN-g) werden als mögliche Auslöser für den BAFF-Anstieg diskutiert (Nardelli et al. 2001), der genaue Mechanismus ist bisher allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.



Da Monozyten die Hauptproduzenten des in der Peripherie zirkulierenden löslichen BAFF sind (Moore et al. 1999; Schneider et al. 1999; Nardelli et al. 2001), war das Ziel dieser Arbeit, die Expression von BAFF in Monozyten unter dem Einfluss immunmodulatorischer Substanzen zu untersuchen.

## **1. Das Modell U937 – Stärken & Schwächen**

Zur Untersuchung der BAFF-Expression in Monozyten wurden zunächst drei etablierte, immortalisierte Zelllinien, U937, HL-60 und THP-1 verwendet, um die Mehrheit der Probleme, die eine Monozyten-Primärkultur mit sich bringt, einschließlich limitierte Verfügbarkeit der Zellen, hohe Kosten und zeitaufwendige Isolierungsprozesse, zu umgehen. U937 ist eine humane, histiozytische Lymphomzelllinie, welche dem promonozytischen Entwicklungsstadium entspricht (Sundstrom und Nilsson 1976; Auwerx 1991). THP-1 stammt aus einer humanen myeloiden Leukämie und ist in der Monozytenentwicklung weiter fortgeschritten (Tsuchiya et al. 1980; Auwerx 1991). HL-60, hat ihren Ursprung in einer akuten myeloiden Leukämie. Es handelt sich um promyeloide Zellen, die im Vergleich zu den anderen beiden verwendeten Zelllinien relativ undifferenziert sind (Collins et al. 1977; Auwerx 1991). Anhand dieser drei Zelllinien konnte die basale Expression von BAFF in verschiedenen Entwicklungsstadien von Monozyten untersucht werden. In allen drei Zelllinien war eine BAFF-Expression auf der Zelloberfläche und im Zytoplasma nachweisbar, welches die bisher publizierten Ergebnisse bestätigt (Nardelli et al. 2001). Allerdings unterschieden sich die Zelllinien in der Stärke der BAFF-Expression. So zeigten U937-Zellen auf ihrer Zytoplasmamembran und bei der Sekretion die höchsten Level. Im Gegensatz dazu exprimierten und sezernierten THP-1-Zellen signifikant weniger BAFF. Diese Unterschiede sind vermutlich durch ihre unterschiedliche Herkunft und ihr unterschiedliches Entwicklungsstadium bedingt, was die Hypothese erlaubt, dass Monozyten in den frühen Entwicklungsstadien mehr BAFF exprimieren als in Späteren. Angesichts ihrer hohen, basalen BAFF-Expression und Freisetzung wurde die Zelllinie U937 als Modell für die weiteren Experimente gewählt.

Trotz der Gemeinsamkeiten zwischen myelomonozytischen Zelllinien wie U937 und primär isolierten Monozyten gibt es doch zahlreiche Unterschiede, z. B. in der Reaktivität auf Zytokine (Gessl et al. 1993). Aus diesem Grund wurden die Schlüsselexperimente nicht nur in dem Zelllinienmodell U937, sondern ebenfalls in primär isolierten Monozyten durchgeführt.

Die geringe basale BAFF-Expression primär isolierte Monozyten konnte in Vorversuchen durch LPS aktiviert werden, so dass sie der Oberflächenexpression von U937-Zellen entsprach. Im Gegensatz dazu zeigten Letztere keine Veränderung der BAFF-Expression durch LPS. Möglicherweise ist die basale Expression in U937-Zellen auf so hohem Niveau, dass sie sich nicht mehr weiter mit exogenen Stimuli verstärken lässt. Auch eine Reduzierung des FCS-Gehaltes im Stimulationsmedium konnte keinen Reaktivitätsanstieg herbeiführen (nicht gezeigt).

## **2. Modulation des B-Zell-aktivierenden Faktors BAFF in Monozyten**

Zur Behandlung von B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie der akut inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (AIDP) oder der chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP) werden heutzutage intravenöse Immunglobuline (IVIg) und intravenöse Corticosteroide als Standardtherapien eingesetzt (Hughes et al. 2003; Mahdi-Rogers und Rajabally 2010; Tracy und Dyck 2010). IVIg ist relativ gut verträglich, allerdings ist seine Herstellung kostenintensiv und limitiert (Mahdi-Rogers und Rajabally 2010). Corticosteroide sind im Gegensatz dazu günstig in der Herstellung, verursachen jedoch teils schwerwiegende Nebenwirkungen wie hohen Blutdruck, Osteoporose und Diabetes (Lukert und Raisz 1990; Biering et al. 2000). Für beide Therapien werden zahlreiche Wirkmechanismen postuliert, z. B. eine Modulation des Komplementsystems und der B- und T-Zellen durch IVIg, oder die Hemmung der Proliferation von Lymphozyten durch Corticosteroide. Die Wirkung auf die Expression des B-Zellaktivierenden Faktor BAFF wurde bisher noch nicht untersucht.

### **2.1 BAFF – Ein neues Target für IVIg?**

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Effekte von IVIg auf die BAFF-Expression und -Freisetzung in Monozyten untersucht. Mit unterschiedlichen Methoden (FACS, WB) konnte gezeigt werden, dass therapeutische Konzentrationen von IVIg (5 und 25 mg/mL) zu einer signifikanten Herabsetzung der BAFF-Expression auf membranständiger und zytoplasmatischer Proteinebene in U937-Zellen führten. Der Effekt war

konzentrationsabhängig und maximal nach 72 h. Bei allen durchflusszytometrischen Experimenten wurden neben den spezifischen Antikörpern (anti-BAFF, anti-CD14) Isotypkontrollen mitgeführt. Dies geschah zum einen, um falsch-positive Ergebnisse durch unspezifische Bindung auszuschließen, zum anderen, um zu vermeiden, dass in der IVIg-Präparation enthaltene Antikörper Zellantigene binden, was ein falsch negatives Ergebnis zur Folge hätte. Für IVIg wurde bereits beschrieben, dass sie z. B. Antikörper gegen APRIL und BAFF enthalten können (Le Pottier et al. 2007).

Aufgrund der Tatsache, dass BAFF auch als lösliche Form vorliegen kann (Moore et al. 1999; Schneider et al. 1999), wurden die Kulturüberstände der stimulierten U937-Zellen mittels ELISA untersucht. IVIg reduzierte neben der zellulären Expression ebenfalls die Sekretion von BAFF. Dabei ist anzumerken, dass die basale BAFF-Freisetzung im Versuchsverlauf stark zunahm. Das Phänomen ist darauf zurückzuführen, dass dem ELISA eine quantitative Konzentrationsbestimmung zugrunde liegt, daher ist die kumulierte BAFF-Sekretion in einer 72 h-Kultur höher als in einer 24 h-Kultur.

Identische Effekte konnten in Schlüsselexperimenten auch für primär isolierte, LPS-aktivierte Monozyten aus gesunden Probanden erhalten werden, wodurch eine physiologische Relevanz angenommen wird. Diese *in vitro*-Daten werden durch die Beobachtung aus einer im hiesigen Labor durchgeführten Studie mit IVIg-behandelten CIDP-Patienten (0,4 g/kg KG pro Tag) bestätigt, in deren Verlauf die BAFF-Serumkonzentrationen dieser Patienten abnahm (Bick et al., in Vorbereitung), wodurch die physiologische Relevanz nun bestätigt wurde. Die BAFF-Abnahme konnte sogar mit dem Therapieerfolg korreliert werden. Ähnliche Beobachtungen wurden in einer Studie mit Kawasaki-Patienten beschrieben (Doi et al. 2010). Somit kann die BAFF-Modulation als weiterer möglicher Wirkmechanismus für IVIg angesehen werden.

Um den oben beschriebenen Wirkmechanismus weiter zu charakterisieren, wurde der Einfluss von IVIg mittels BAFF-spezifischer Primer auf mRNA-Ebene untersucht. Die Daten der Echtzeit-PCR wurden durch Normalisierung mit einem *housekeeping*-Gen (GAPDH) unter Berücksichtigung der Primereffizienz generiert, weil dies die genaueste Methode zur mRNA-Quantifizierung darstellt (Pfaffl 2001). Auf mRNA-Ebene vermittelte IVIg ebenfalls einen reduzierenden, konzentrationsabhängigen Effekt auf BAFF. Es zeigte sich, dass die Expression der mRNA für beide IVIg-Konzentrationen über die Zeit tendenziell zunahm, so dass nach 72 h Inkubation mit 5 mg/mL IVIg keine Abnahme des BAFF-mRNA-Levels mehr zu detektieren war. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da eine Regulation der Transkription der Translation voran geht.

Da eine Herunterregulierung auf Protein- sowie auf mRNA-Ebene detektiert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass BAFF mittels transkriptionaler Regulation durch IVIg moduliert wird.

Die Rolle von IVIg als negativer Modulator der Zytokin-Expression wird gestützt durch Arbeiten für TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Monozyten (Rhoades et al. 2000; Tha-In et al. 2007).

Der nächste Schritt war die Untersuchung einer möglichen Reversibilität der Wirkung von IVIg, da im menschlichen Organismus das infundierte IVIg im Serum innerhalb der ersten drei Tage um 50 % abnimmt (Dalakas 2002). Nach anfänglichem Abfall durch das hochdosierte IVIg stieg die BAFF-Expression nach dessen Entfernung in U937-Zellen wieder an, bis sie nach weiteren 48 h das Ausgangsniveau unstimulierter Zellen erreichte. Folglich ist die permanente Anwesenheit von IVIg die Voraussetzung für dessen Wirksamkeit. Diese *in vitro*-Daten stimmen mit Beobachtungen aus Patienten-Studien überein; so wurde für Patienten mit einem Stiff-Person-Syndrom (eine Erkrankung, die ebenfalls mit IVIg behandelt wird) ein Wiederauftreten der Spasmen nach Austausch der IVIg-Infusionen gegen Placebo beschrieben (Dalakas 2006). Bei vielen Patienten mit CIDP oder multifokaler motorischer Neuropathie muss eine Wiederholung der IVIg-Infusionen in regelmäßigen Abständen (3-4 Wochen) durchgeführt werden, um eine kontinuierliche Besserung aufrecht zu erhalten (Van den Berg et al. 1995; Dalakas 2004; Terenghi et al. 2004; Sapir et al. 2005; Brannagan 2009; Tschernatsch und Blaes 2010)

Die zur Behandlung von Patienten eingesetzten IVIg-Präparationen unterscheiden sich, je nach Hersteller, in ihrer Herstellungsweise, ihrer IgG-Konzentration und den zugesetzten Stabilisatoren. Außerdem ist aufgrund ihres Ausgangsmaterials, dem humanen Plasma, eine Varianz der Antikörperzusammensetzung von Charge zu Charge zu erwarten. Infolgedessen wurden neben *Gamunex*® (Gam) zwei weitere Präparate, *Octagam*® (Oct) und *Sandoglobulin*® (San), in Experimenten untersucht, um ausschließen zu können, dass die bisher mit Gam erhaltenen Ergebnisse Präparat-spezifisch sind. Alle untersuchten Präparate führten zu einer Herabsetzung der BAFF-Expression und Sekretion. Allerdings gab es Unterschiede in der Ausprägung des Effektes. Anschließende Untersuchungen zur Zytotoxizität der Präparate zeigten, dass die Stimulation mit Oct zu einem 6fachen Anstieg der Apoptose verglichen mit unstimulierten U937-Zellen führte. Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass Oct eine pro-apoptotische Wirkung auf Monozyten hat. Andere Forschergruppen wiesen dies bereits für IVIg-Präparationen wie San nach, nicht aber für Oct. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang eine Fas-vermittelte Apoptose (Prasad et al. 1998). Die Abnahme der BAFF-Expression und Sekretion lässt sich damit jedoch nicht erklären, da auch Gam entsprechende Effekte auslöst, jedoch weniger apoptotisch ist.

Obwohl sich die verschiedenen IVIg-Präparationen in ihrer Wirkungsintensität unterscheiden, kann dennoch zusammenfassend eine herunter regulierende Wirkung auf die BAFF-Expression und –Freisetzung postuliert werden. Überdies waren die Effekte der hauptsächlich eingesetzten IVIg-Präparation (*Gamunex®*) konstant, trotz der (zwangsläufigen) Verwendung unterschiedlicher Chargen. Analoge Resultate sind für andere Faktoren und Zelllinien in der Literatur beschrieben wie für die Herunterregulierung von Oberflächenmoleküle in dendritischen Zellen (Prasad et al. 1998; Aktas et al. 2001; Bayry et al. 2003; Zhang et al. 2006).

Vor dem Hintergrund der bisher erarbeiteten Daten wurde angenommen, dass der Wirkmechanismus von IVIg durch einen Inhaltsstoff vermittelt wird, der in allen untersuchten Präparationen und Chargen enthalten ist: das IgG.

Interessanterweise führte in vergleichenden Versuchen mit IVIg das isolierte IgG zu einer stärkeren Reduktion der membranständigen und zytosolischen BAFF-Expression sowie dessen Freisetzung. Besonders deutlich waren die Unterschiede in Bezug auf das membranständige BAFF. Möglicherweise führen die in IVIg-Präparationen enthaltenen Antiidiotyp-Dimere zu einer Abschwächung der Wirkung auf die BAFF-Expression. Diese Dimere machen ca. 3-15 % der in IVIg enthaltenen IgG aus, weniger als 1 % der IgG formen Aggregate (Tankersley 1994). Die Dimer-Bildung ist umso höher, je mehr verschiedene Spender-Seren zur Herstellung verwendet werden (Dalakas 2002). Somit wäre zu erwarten, dass der Anteil an Dimeren bei IgGs von nur 3 Spendern geringer ist. Auch wenn Dimere im Gegensatz zu Monomeren antiinflammatorische Effekte wie die NK-Zell-vermittelte antikörperabhängige Zellzytotoxizität (ADCC) fördern (Tha-In et al. 2007), könnten sie im Fall der BAFF-Regulation eine Effektabschwächung bewirken. Weitere Ursachen für die Unterschiede zwischen der IVIg-Präparation und dem eigens isolierten IgG könnten in der unterschiedlichen Aufarbeitungsweisen und unterschiedlichen Immunglobulin-Zusammensetzung liegen.

Die Identifizierung von IgG als Haupteffektor der IVIg-Präparationen führte zu der Frage, ob sich die Modulation des BAFF-Systems in Monozyten einem Molekülteil im Speziellen zuordnen lässt. Die Versuche, dafür Fab- von Fc-Fragmenten mittels verschiedener chromatographischer Verfahren zu separieren, blieben trotz Optimierung der einzelnen Aufreinigungsschritte ohne zufriedenstellenden Erfolg. Zum einen war die Auftrennung mit der ProteinA-Säule nicht vollständig, so dass jede der beiden Fraktionen, Säulendurchfluss und Eluat, das andere IgG-Fragment zumindest in Spuren aufwies. Da die Beladungskapazität der Säule nicht überschritten und Standardpuffer verwendet wurden, sind technische Fehler

relativ unwahrscheinlich. Demzufolge wurde vermutet, dass die im Durchfluss enthaltenen Fc-Fragmente aus IgG3-Molekülen stammen könnten, eine Isoform des IgG, die ProteinA nicht binden kann. Theoretisch könnten sie auch von IgA- oder IgM-Molekülen sein, die neben IgG in Spuren in der IVIg-Präparation enthalten sind. Der Austausch der ProteinA-Säule gegen eine ProteinG-Säule brachte keine Verbesserung der Auftrennung (nicht gezeigt). ProteinG interagiert wie ProteinA ebenfalls über den Fc-Teil mit IgG und kaum bzw. nicht mit IgA und IgM. Im Gegensatz zu IgA bindet es jedoch alle IgG-Isoformen. Vor diesem Hintergrund sind für die im Durchfluss enthaltenen Fc-Fragment-Spuren IgA und IgM als Quelle zu favorisieren. Für die in der Elution vertretenen Fab-Fragmente konnte letztlich keine Erklärung gefunden werden.

Zum anderen wurde auch mit dem Einsatz einer ProteinL-Säule keine vollständige Reinheit der Fc-Fraktion erlangt. ProteinL interagiert über die Fab-Fragmente mit IgG, aber auch mit IgA und IgM. In diesen Experimenten enthielt der Fc-Durchfluss, sogar nach wiederholter Beladung der Säule, Fab-Fragmente, die demnach nicht von ProteinL auf der Säule gebunden wurden. Es ist denkbar, dass diese aus *lamda*-Ketten bestehen, weil ProteinL diese Isoform der leichten Kette nicht binden kann (Nilson et al. 1993).

Infolge dessen wurden für die entsprechenden Versuche F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente eingesetzt, die freundlicherweise von Prof. S. Kaveri (Paris) zur Verfügung gestellt wurden. Die Stimulation von U937-Zellen mit äquimolaren Konzentrationen von F(ab')<sub>2</sub> aus IVIg führte auf Proteinebene (membrangebunden und intrazellulär) sowie bei der Freisetzung zu einer Herunterregulierung von BAFF, die der des vollständigen IVIg gleichkommt. Diese Beobachtungen sprechen interessanterweise für eine deutliche Beteiligung der F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente an der Vermittlung der IVIg-Effekte auf die BAFF-Expression in Monozyten. In Folge von weiteren Experimenten, die zeigten, dass IVIg auch die mRNA der FcγRs, CD16, CD32b und CD64, inhibiert, kann die Beteiligung der Fc-Teile an der Effekten von IVIg jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Vielmehr ist ein Zusammenspiel aus mehreren immunmodulatorischen Effekten zu erwarten. Diverse *in vitro* Experimente haben gezeigt, dass IVIg seine Effekte über FcγR-abhängiges aber auch –unabhängiges Signalling vermitteln kann, z. B. bei der Inhibierung der Lyseaktivität von natürlichen Killerzellen (Tha-In et al. 2007) oder der IL-12-Produktion in dendritischer Zellen (Bayry et al. 2003). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Modulation der Transkriptionslevel der FcγRs durch IVIg ist konsistent mit in der Literatur beschriebenen Transkriptionsassays von Monozyten aus Patienten mit der Kawasaki-Krankheit, deren Transkriptom vor und nach der Behandlung mit hochdosiertem IVIg dargestellt wurde (Abe et al. 2005).

Ob der Effekt der Fc-Fragmente in dem in dieser Arbeit beschriebenen Modell stärker oder schwächer als der von F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten ist, bleibt durch zukünftige Studien zu klären. Beide Szenarien sind in der Literatur, z. B. für die Inhibierung der IgE-Produktion in B-Zellen und für die Inhibierung der Zytotoxizität natürlicher Killerzellen (Klaesson et al. 1996; Nachbaur et al. 1997; Zhuang und Mazer 2001; Jolles et al. 2005), beschrieben.

Abgesehen von den bereits diskutierten, direkten Einflüsse von IVIg auf die zelluläre BAFF-Expression, wären auch andere in der Literatur beschriebenen Mechanismen denkbar, die indirekt zu einer Modulation von BAFF in Monozyten führen können. So wird z. B. postuliert, dass IVIg seine Wirkung durch enthaltenen Antiidiotypen vermittelt, die u. a. gegen Zytokine wie BAFF, Zytokinrezeptoren und Fas gerichtet sind (Prasad et al. 1998; Le Pottier et al. 2007; Negi et al. 2007). Falls die im IVIg enthaltenen Antikörper dieselbe Antigen-Struktur binden wie der Antikörper des ELISA, würde dieser das bereits von IVIg-gebundene lösliche BAFF nicht erkennen können, da die Bindestelle bereits blockiert ist, mit der möglichen Folge eines falsch negativen Ergebnisses. Um dies vollständig auszuschließen, müsste zunächst die Konzentration des im IVIg enthaltenen anti-BAFF-AK mittels Titration bestimmt werden, um die entsprechende Konzentration von anti-BAFF-AK als Kontrolle in den Versuch einzusetzen. Außerdem wäre die Identifizierung des Epitops bzw. der Epitope, die von den im IVIg enthaltenen anti-BAFF-AK erkannt werden, Voraussetzung um eine möglichst zuverlässige Kontrolle zu erhalten.

Obwohl die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse die Mechanismen für die Herunterregulierung der BAFF-Expression und –Freisetzung in Monozyten durch IVIg nicht vollständig identifizierten, konnte zumindest ein Einblick in diesen Regulationszweig des BAFF-Systems erworben werden. Verschiedene Hinweise lassen vermuten, dass der Transkriptionsfaktor NFκB der zentrale Mediator für die beschriebenen Effekte ist. Zum einen enthält der Promoter des BAFF-Gens eine Konsensussequenz für diesen Transkriptionsfaktor (Fu et al. 2006), zum anderen wurde für IVIg die Inhibierung von NFκB in verschiedenen Zelltypen, u. a. Monozyten beschrieben (Ichiyama et al. 2004; Sapir et al. 2005; Makata et al. 2006).

## 2.2 BAFF – ein neues Target für Corticoide?

Im zweiten Teil dieser Arbeit lag der Fokus auf der Untersuchung der Effekte von Corticosteroiden auf das BAFF-System in Monozyten, da diese Wirkstoffgruppe seit Jahren neben IVIg als Standardtherapie für B-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen eingesetzt wird (Tracy und Dyck 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels verschiedener Methoden (FACS, WB) die Reduktion der BAFF-Expression durch Dexamethason (Dex), einem Corticosteroid, auf der Zelloberfläche sowie im Zytosol von U937-Zellen gezeigt. Die ebenfalls untersuchte Freisetzung von BAFF wies wie die Oberflächenexpression eine konzentrationsabhängige, signifikante Reduktion durch Dex auf. Die herab regulierende Wirkung von 1  $\mu$ M Dex konnte in Experimenten mit primär isolierten, LPS-aktivierten Monozyten auf allen drei untersuchten Proteinebenen bestätigt werden, wodurch auch in diesem Versuchskomplex die physiologische Relevanz verdeutlicht wird.

Infolge der Nachweisbarkeit einer Reduktion von BAFF auf mRNA-Ebene ist anzunehmen, dass die herunter regulierende Wirkung von Dex auf die BAFF-Expression in der Hauptsache auf einer transkriptionalen Modulation beruht. Diese Daten werden gestützt von veröffentlichten Ergebnissen aus Patientenstudien, bei denen die Inhibierung der BAFF-Expression in Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis bzw. in PBMCs von Patienten mit Immuner Thrombozytopenie durch die Behandlung mit Dex beschrieben wurde (Reyes et al. 2008; Zhu et al. 2009).

Nachdem für einen Vertreter (Dex) aus der Gruppe der Corticosteroide ein Zusammenhang mit der Herabsetzung der BAFF-Expression festgestellt worden war, wurden zwei weitere Präparate, Budesonid (Bud) und 6 $\alpha$ -Methylprednisolon (6 $\alpha$ -MP) aus dieser Wirkstoffgruppe untersucht, um einen Präparat-spezifischen Effekt auszuschließen. Bud zeigte bei 10 und 100 nM eine mit Dex vergleichbare Wirkungsstärke auf die Expression (membrangebunden und intrazellulär) und Sekretion von BAFF. Daraus ergibt sich eine ca. 10-100fach höhere Wirksamkeit für Bud, wie sie bereits in der Klinik beobachtet wurde (Brattsand und Selroos 1994). 6 $\alpha$ -MP erzielte auch ähnliche Ergebnisse wie Dex. Folglich konnte zusammenfassend mit diesen Resultaten gezeigt werden, dass die Modulation von BAFF nicht Wirkstoff-spezifisch ist, sondern als neuer Wirkmechanismus für die Corticosteroid als Wirkstoffgruppe beschrieben werden kann.

Zur weiteren Charakterisierung des Wirkmechanismus von Dex wurde in dieser Arbeit das Anti-Corticoid RU486 (= Mifepriston) eingesetzt. RU486 konkurriert mit Dex und anderen Corticosteroiden um die Ligandenbindedomäne der Ligandenbindestelle am Glucocorticoide-



Rezeptor (kompetitive Hemmung). RU486 bindet allerdings mit einer höheren Affinität an den Rezeptor. Die Bindung von RU486 führt im Rezeptor ebenfalls zu einer Transkonformation, die sich aber von der durch Bindung des korrekten Agonisten unterscheidet (Gagne et al. 1986; Baulieu 1997; Garside et al. 2004). Translokation und DNA-Bindung des Rezeptors sind nach wie vor möglich, vermutlich werden aber andere Co-Aktivatoren bzw. – Repressoren rekrutiert (Beck et al. 1993; Bledsoe et al. 2002; Kauppi et al. 2003). Die Cokultivierung von U937-Zellen mit Dex und RU486 resultierte bei der Expression von membrangebundenem und intrazellulärem BAFF sowie dessen Freisetzung in einer signifikanten Abschwächung des Dex-vermittelten Effekts bis hin zur fast vollständigen Erlangung des Ausgangsniveaus. Der Antagonist selbst führte ab einer Konzentration von 2  $\mu$ M ebenfalls zu einer signifikanten Reduzierung der Zytokinexpression, wodurch er neben dem antagonistischen Effekt auch agonistische Eigenschaften aufwies. Diese Beobachtung wird von Ergebnissen aus Tierstudien gestützt, für die konzentrationsabhängige, agonistische Effekte von RU486 auf die Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrinden-Achse (HPA) beschrieben sind (Havel et al. 1996; Bachmann et al. 2003). Infolge der Annahme, dass die antagonistischen Effekte von RU486 auf die Formierung „unproduktiver“ DNA-GR-Interaktionen zurückzuführen sind, welche außerstande sind die transkriptionale Verstärkung zu initiieren (Segnitz und Gehring 1990), ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Dex-vermittelten, RU486-antagonisierten Effekt auf BAFF um eine genomische Regulation handelt. Die Identifizierung von einem potentiellen *glucocorticoid receptor response element* (GRE) bzw. halben GREs im Promoter des BAFF-Gens bekräftigen diese Hypothese. GREs sind kurze Nukleotidsequenzen in GR-regulierten Genen, an die der GR bindet und die Transkription moduliert. Einfache GREs folgen dem Muster 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3', vor allem das 3'-Ende ist hoch konserviert (Nordeen et al. 1990). nGREs zeichnen sich durch weniger stark konservierte Konsensussequenzen (KSs) (ATYACnnTnTGATCn) und eine Variabilität in der Länge der „Distanzhalter“ aus (Schoneveld et al. 2004). Durch *in silico* Untersuchungen des BAFF-Promoters konnte folgende Sequenz identifiziert werden: 5'-GGGACAggcTGTTCA-3'. Sie entspricht zu fast 100 % der in der Literatur beschriebenen Sequenz eines GRE und liegt ca. 400 bp vor dem Transkriptionsstart (Pos. -443 bis -428). Überschneidungen mit der Konsensussequenz von anderen Transkriptionsfaktoren (TFs), die für das BAFF-Gen beschrieben sind, z. B. NF $\kappa$ B und NFAT (Fu et al. 2006), konnten nicht identifiziert werden. Der Abstand zu der NF $\kappa$ B-KS beträgt ca. 309 bp, zu der NFAT-KS ca. 32 bp. Daher ist eine negative Regulation von BAFF durch Dex, bedingt durch das Konkurrieren mit anderen bekannten TFs um die gleiche

Sequenz, unwahrscheinlich. Wegen der Sequenzähnlichkeit mit positiver GREs ist allerdings davon auszugehen, dass es sich nicht um ein nGRE handelt. Aufgrund der Ergebnisse aus den Experimenten mit RU486 ist die Transrepression jedoch die wahrscheinlichste Erklärung für die negative Regulation. Bei diesem Mechanismus interagiert GR über Protein-Protein-Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren wie NFκB, NFAT und AP-1 und verhindert dadurch die Bindung an deren *response*-Elemente und somit die Transkription entsprechender Gene (Paliogianni et al. 1993; De Bosscher et al. 1997; Garside et al. 2004; Schoneveld et al. 2004).

Die darauf folgenden Untersuchungen zur Dex-vermittelten Translokation von GR-α in den Nukleus mittels Western Blot-Analyse brachten wider erwarten keinen deutlichen Fortschritt, da keine Translokation des GR in den Nukleus detektiert werden konnte. GR-α wurde unter den beschriebenen Versuchsbedingungen (Präinkubation mit TNF-α bzw. LPS, dann Stimulation mit Dex) im Zytoplasma, nicht aber im Nukleus nachgewiesen. Möglicherweise scheiterte die Nachweisbarkeit des Rezeptors an technischen Gegebenheiten, da er auch im Gesamtzelllysat nicht detektierbar war. Dies könnte aber auch an einer unter der nachweisbaren Konzentrationsmenge befindlichen Konzentration im Nukleus liegen. Falls dieses Ergebnis tatsächlich den Gegebenheiten in der Zelle entspricht, wären sämtliche Regulationsmechanismen auszuschließen, die eine Translokation von GR in den Kern voraussetzen, somit sämtliche genomischen Mechanismen. In diesem Fall könnte die negative BAFF-Regulierung durch eine direkte Interaktion von GR mit der mRNA vermittelt werden, ähnlich wie die Regulation des Monozyten Chemoattraktanzprotein 1 (MCP-1). Für dieses Protein wurde eine direkte Bindung von Dex an dessen mRNA beschrieben, wodurch sie verstärkt abgebaut wird (Dhawan et al. 2007).

### **3. NFκB – Der gemeinsame Nenner?**

NFκB ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, der mittels multipler Signale angeregt wird, in den Kern zu translozieren, um dort die Transkription einer Vielzahl von Genen zu modulieren. Das System, das den NFκB-Weg reguliert, ist sehr komplex und schließt unter anderem die Regulation des NFκB-Inhibitors IκB und die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren ein. Mit diesem Hintergrund liegt die Vermutung nahe, dass BAFF, dessen Promoter eine NFκB-Konsensussequenz (KS) aufweist, über verschiedenen Stimuli durch NFκB reguliert werden kann. Obwohl sich die Stimuli IVIg und Dex in ihrem

strukturellen Aufbau und vermutlich in ihrer zellulären Zielstruktur stark voneinander unterscheiden, wurde dennoch für beide eine herunter regulierende Wirkung auf die NF $\kappa$ B-Aktivität beschrieben (Ichiyama et al. 2004; Makata et al. 2006). Die Wirkung von IVIg auf NF $\kappa$ B beruht vermutlich auf einer Inhibierung der I $\kappa$ B-Degradierung, wodurch der Transkriptionsfaktor daran gehindert wird, in den Nukleus zu translozieren (Ichiyama et al. 2004). Für Dexamethason wurde dagegen gezeigt, dass es NF $\kappa$ B durch Protein-Protein-Interaktion oder durch die Konkurrenz um Co-Aktivatoren inhibieren kann (Kamei et al. 1996; De Bosscher et al. 1997; Sheppard et al. 1998; Adcock und Caramori 2001; Garside et al. 2004; De Bosscher et al. 2006; Kassel und Herrlich 2007; Gossye et al. 2008). Ein weiterer Fakt, der für eine Beteiligung von NF $\kappa$ B bei beiden Regulationsmechanismen spricht, ist die Tatsache, dass für IVIg, stärker als Dex, die Translokation von NF $\kappa$ B in den Nukleus gehemmt wird (Makata et al. 2006). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression und Freisetzung von BAFF ebenfalls in stärkerem Maße durch IVIg als durch Dex beeinträchtigt wurde. Für die praktische Anwendung in der Klinik würde dies bedeuten, dass Erkrankungen, die durch eine Überproduktion von BAFF in Monozyten charakterisiert sind, effektiver mit IVIg behandelt werden können.

## **4. Ausblick**

### **4.1 BAFF**

Die Beleuchtung und Aufklärung des BAFF-Systems kann uns ein grundlegendes Verständnis für die B-Zellentwicklung und Dysregulation ermöglichen, das die Identifizierung neuer Angriffspunkte für gezielte Therapien von Autoimmunerkrankungen verspricht. So führten die bisherigen Erkenntnisse über BAFF und dessen tragende Rolle bei Entwicklung und Progression von B-Zellvermittelten Autoimmunerkrankungen zu der Entwicklung diverser Medikamente, die in das BAFF-System eingreifen, z. B. Anti-BAFF und Fusions-IgG gegen die drei BAFF-Rezeptoren (Baker et al. 2003; Sutherland et al. 2006). Künftig sollen sie zur Behandlung von SLE, SS und MS eingesetzt werden.

Für zukünftige Experimente zur Untersuchung der Funktionen von BAFF sind aber auch die T-Zellen als Target von großem Interesse, weil über die Rolle des Zytokins in der B-Zellentwicklung hinaus sich die Hinweise mehren, dass es auch auf T-Zellen Einfluss nimmt. Das Zytokin zeigte costimulatorische Aktivität in allen Differenzierungsstadien reifer T-

Zellen, begleitet von IL-2-Produktion und der Expression von CD25 (Huard et al. 2001; Huard et al. 2004). Eine weitere Veröffentlichung berichtet von BAFF als Überlebensfaktor spezifisch für aktivierte aber nicht für naive T-Zellen (Ng et al. 2004). So führte die Anwendung von Anti-BAFF-R-Antikörper im murinen als auch im humanen Organismus zur Inhibierung der T-Zellaktivierung (Huard et al. 2001; Ng et al. 2004) und gibt Hinweis darauf, dass BAFF-R auch bei T-Zellen eine zentrale Rolle in der Übermittlung der BAFF-Signale spielt. Interessanterweise gibt es Anhaltspunkte, dass T-Zellen nur durch immobilisiertes BAFF stimuliert werden, nicht aber, wie B-Zellen, durch die lösliche Form. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es unterschiedliche Wirkmechanismen für BAFF auf B- und T-Zellen gibt. Auf B-Zellen würde BAFF demnach als Zytokin wirken, was die Beeinflussung der Ziel-Zellen fernab von den produzierenden Zellen ermöglicht. Im Gegensatz dazu übermittelt BAFF die Signale an T-Zellen vermutlich durch direkten Zell-Zell-Kontakt. Ein solcher Kontakt passiert sehr wahrscheinlich zwischen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) in der Anwesenheit von Antigenen. Auch wenn die genaue Aufgabe von BAFF bei T-Zellentwicklung und -Funktion noch weiter beleuchtet werden muss, kann bereits eine Steigerung der T-Zell-Reaktion durch die costimulatorische Aktivität von BAFF angenommen werden, die wichtig für die Entwicklung einer vollständigen T-Zell-Antwort auf primäre Stimulationssignale ist. Folglich zeichnet sich eine regulierende Aktivität von BAFF im humoralen als auch zellulären System der Immunantwort ab. Dies würde aus klinischer Sicht bedeuten, dass das Spektrum der potentiell durch BAFF-Antagonisten behandelbaren Erkrankungen um T-Zell-vermittelte Krankheiten wie Typ 1 Diabetes, inflammatorische Gelenkerkrankung (Szabo et al. 2003; Mackay et al. 2005) erweitert werden kann.

Ein weiterer Aspekt, der BAFF zukünftig für die Klinik sehr interessant machen wird, ist sein viel versprechendes Potential als Diagnoseparameter. Da in der Medizin nicht nur die Therapie von Erkrankungen sondern auch deren frühzeitige Diagnose von enormer Bedeutung ist, wird unablässig nach Faktoren gesucht, die eine gezielte, zuverlässige Unterscheidung von „gesund“ und „krank“ ermöglichen. BAFF könnte solch ein viel versprechender Diagnoseparameter für Autoimmunerkrankungen sein, da dessen Level in betroffenen Patienten signifikant höher ist als in gesunden Probanden. Für Asthma wurde BAFF bereits als Diagnoseparameter postuliert (Kang et al. 2006), für weitere Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Systemischer Lupus erythematodes, Sjögrens Syndrom, Wegeners Granulomatose, Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom und Chronisch-entzündliche demyelinisierende Polyneuropathien wäre es aufgrund der hohen BAFF-Level in den

Patienten denkbar. Darüber hinaus könnte BAFF auch ein viel versprechenden Parameter für die Prognose von Behandlungserfolgen sein, wie bei der Behandlung von diffusen B-Zell-Lymphomen mit Rituximab bereits diskutiert wird (Kim et al. 2008).

## **4.2 IVIg**

Aus experimenteller Sicht gilt es in zukünftigen Experimenten zu untersuchen, welche Rolle Fc-Fragmente bei der Herunterregulierung von BAFF in Monozyten spielen, nachdem dies in der vorliegenden Arbeit für F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente bereits gezeigt wurde. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob spezifische F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente die Effekte vermitteln, z. B. Antikörper gegen Oberflächenstrukturen wie BAFF oder FcγRs. So wurde beispielsweise eine krankheitsspezifische Fraktion in IVIg beschrieben, die essentiell für die Effekte von IVIg bei der experimentellen MG sein ist (Fuchs et al. 2008). Für eine weiterführende Charakterisierung der molekularen Mechanismen stehen weitere Experimente aus, z. B. die Aufklärung des zugrunde liegenden Signalweges oder der Einfluss auf NFκB, die durch den Einsatz diverser Inhibitoren, Microarrays und Transkriptionsfaktorassays beleuchtet werden können.

Außerdem wäre es von großer klinischer Bedeutung weiter IVIg-behandelte Erkrankungen zu identifizieren, deren Verlauf mit der Reduktion der BAFF-Serum-Level korreliert ist. In diesen Fällen ergäbe sich auch für BAFF-Antagonisten vielversprechende, neue Ziele. Die betroffenen Patienten könnten gezielter und kostengünstiger behandelt werden. In der Literatur wurde eine solche Korrelation unter anderem bereits für Patienten mit der Kawasaki-Krankheit (Doi et al. 2010) beschrieben.

## **4.3 Dexamethason**

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten potentiellen GRE im BAFF-Promoter liefern die Grundlage für künftige Expressionsanalysen. So könnten z. B. Mutationen innerhalb dieser Sequenzen Aufschluss darüber geben, ob es sich dabei um funktionelle Elemente handelt oder nicht. Des weiteren sind Versuche zur Klärung der Fragen notwendig, ob die Effekte auf BAFF durch die Interaktion mit einem nGRE, die Interaktion mit anderen TFs wie NFκB oder durch eine Reduzierung der BAFF-mRNA-Stabilität bedingt sind. Dies könnte z. B. mit GR-Mutanten, die nicht in der Lage sind Dimere zu bilden, detaillierter analysiert werden, da die

Dimerbildung wichtig für die direkte Interaktion des Rezeptors mit der DNA, nicht aber für die Interaktion mit anderen TFs ist (Heck et al. 1997; Schoneveld et al. 2004; De Bosscher und Haegeman 2009). Wie bei IVIg kann auch für Dex die Aufklärung der zugrunde liegenden Signalkaskaden durch Inhibitoren zur weiteren Aufklärung der Mechanismen beitragen.

Aus klinischer Sicht wäre es von großem Interesse die BAFF-Level in Corticosteroid-behandelten Patienten zu observieren, um dadurch andere Erkrankungen zu identifizieren, die zukünftig mittels BAFF-Antagonisten nebenwirkungsärmer behandelt werden könnten. Eine Verringerung der BAFF-Level ist bereits in Corticosteroid-behandelten Patienten mit Immunthrombozytopenie (Zhu et al. 2009), idiopathischen, inflammatorischen Myopathien (Krystufkova et al. 2009), Wegeners Granulomatose (Krumbholz et al. 2005), autoimmuner Hepatitis (Migita et al. 2007), Asthma (Kang et al. 2006) und Rheumatoider Arthritis (Reyes et al. 2008) beschrieben. Solche Erkenntnisse machen diese Erkrankungen zu potentiell mit BAFF-Antagonisten behandelbaren Zielen.

## IX Literatur

- ABE, J., et al. (2005). "Gene expression profiling of the effect of high-dose intravenous Ig in patients with Kawasaki disease." *J Immunol* **174**(9): 5837-45.
- ABE, Y., et al. (1994). "Anti-cytokine nature of natural human immunoglobulin: one possible mechanism of the clinical effect of intravenous immunoglobulin therapy." *Immunol Rev* **139**: 5-19.
- ADCOCK, I. M. und G. CARAMORI (2001). "Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids." *Immunol Cell Biol* **79**(4): 376-84.
- AGGARWAL, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." *Nat Rev Immunol* **3**(9): 745-56.
- AGGARWAL, B. B., et al. (1985). "Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization." *J Biol Chem* **260**(4): 2345-54.
- AGGARWAL, B. B., et al. (1984). "Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization." *J Biol Chem* **259**(1): 686-91.
- AKTAS, O., et al. (2001). "Polyspecific immunoglobulins (IVIg) suppress proliferation of human (auto)antigen-specific T cells without inducing apoptosis." *J Neuroimmunol* **114**(1-2): 160-7.
- AMANNA, I. J., et al. (2003). "Enforced bcl-xL gene expression restored splenic B lymphocyte development in BAFF-R mutant mice." *J Immunol* **170**(9): 4593-600.
- AMRAN, D., et al. (1994). "Suppression of cytokine-dependent human T-cell proliferation by intravenous immunoglobulin." *Clin Immunol Immunopathol* **73**(2): 180-6.
- ANDERSSON, J., et al. (1996). "Intravenous immune globulin affects cytokine production in T lymphocytes and monocytes/macrophages." *Clin Exp Immunol* **104 Suppl 1**: 10-20.
- ARNOLD, J. N., et al. (2007). "The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins." *Annu Rev Immunol* **25**: 21-50.
- AUKRUST, P., et al. (1999). "Administration of intravenous immunoglobulin (IVIg) in vivo--down-regulatory effects on the IL-1 system." *Clin Exp Immunol* **115**(1): 136-43.
- AUWERX, J. (1991). "The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation." *Experientia* **47**(1): 22-31.
- BACHMANN, C. G., et al. (2003). "Effect of chronic administration of selective glucocorticoid receptor antagonists on the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis." *Neuropsychopharmacology* **28**(6): 1056-67.
- BAKER, K. P. (2004). "BLyS--an essential survival factor for B cells: basic biology, links to pathology and therapeutic target." *Autoimmun Rev* **3**(5): 368-75.
- BAKER, K. P., et al. (2003). "Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator." *Arthritis Rheum* **48**(11): 3253-65.
- BAKER, S. J. und E. P. REDDY (1996). "Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins." *Oncogene* **12**(1): 1-9.
- BASTA, M., et al. (1989). "Mechanism of therapeutic effect of high-dose intravenous immunoglobulin. Attenuation of acute, complement-dependent immune damage in a guinea pig model." *J Clin Invest* **84**(6): 1974-81.
- BATTEN, M., et al. (2000). "BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes." *J Exp Med* **192**(10): 1453-66.
- BAULIEU, E. E. (1997). "RU 486 (mifepristone). A short overview of its mechanisms of action and clinical uses at the end of 1996." *Ann N Y Acad Sci* **828**: 47-58.

- BAXTER, J. D. und G. G. ROUSSEAU (1979). "Glucocorticoid hormone action: an overview." Monogr Endocrinol **12**: 1-24.
- BAYRY, J., et al. (2003). "Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin." Blood **101**(2): 758-65.
- BAYRY, J., et al. (2003). "Mechanisms of action of intravenous immunoglobulin in autoimmune and inflammatory diseases." Transfus Clin Biol **10**(3): 165-9.
- BECK, C. A., et al. (1993). "The steroid antagonist RU486 exerts different effects on the glucocorticoid and progesterone receptors." Endocrinology **133**(2): 728-40.
- BELVISI, M. G. (2004). "Regulation of inflammatory cell function by corticosteroids." Proc Am Thorac Soc **1**(3): 207-14.
- BIERING, H., et al. (2000). "[Prevalence of diabetes in acromegaly and Cushing syndrome]." Acta Med Austriaca **27**(1): 27-31.
- BIERLING, P. und B. GODEAU (2005). "Intravenous immunoglobulin for autoimmune thrombocytopenic purpura." Hum Immunol **66**(4): 387-94.
- BINSTADT, B. A., et al. (2003). "IgG Fc receptor polymorphisms in human disease: implications for intravenous immunoglobulin therapy." J Allergy Clin Immunol **111**(4): 697-703.
- BLASCZYK, R., et al. (1993). "Soluble CD4, CD8, and HLA molecules in commercial immunoglobulin preparations." Lancet **341**(8848): 789-90.
- BLEDSE, R. K., et al. (2002). "Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition." Cell **110**(1): 93-105.
- BODMER, J. L., et al. (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." Trends Biochem Sci **27**(1): 19-26.
- BOSSEN, C., et al. (2008). "TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts." Blood **111**(3): 1004-12.
- BOSSEN, C. und P. SCHNEIDER (2006). "BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling." Semin Immunol **18**(5): 263-75.
- BRANNAGAN, T. H., 3RD (2009). "Current treatments of chronic immune-mediated demyelinating polyneuropathies." Muscle Nerve **39**(5): 563-78.
- BRATTSAND, R. und O. SELROOS (1994). Current drugs for respiratory diseases: glucocorticoids. New York, Raven Press Ltd.
- BROWNING, J. L. (2006). "B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment." Nat Rev Drug Discov **5**(7): 564-76.
- BUTTGEREIT, F. und A. SCHEFFOLD (2002). "Rapid glucocorticoid effects on immune cells." Steroids **67**(6): 529-34.
- BUTTGEREIT, F., et al. (2004). "Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action." Arthritis Rheum **50**(11): 3408-17.
- CACHERO, T. G., et al. (2006). "Formation of virus-like clusters is an intrinsic property of the tumor necrosis factor family member BAFF (B cell activating factor)." Biochemistry **45**(7): 2006-13.
- CANCRO, M. P. (2004). "Peripheral B-cell maturation: the intersection of selection and homeostasis." Immunol Rev **197**: 89-101.
- CARSWELL, E. A., et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-70.
- CHANG, S. K., et al. (2006). "A role for BLyS in the activation of innate immune cells." Blood **108**(8): 2687-94.
- CHANG, S. K., et al. (2008). "B lymphocyte stimulator regulates adaptive immune responses by directly promoting dendritic cell maturation." J Immunol **180**(11): 7394-403.



- CHEEMA, G. S., et al. (2001). "Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases." Arthritis Rheum **44**(6): 1313-9.
- CHROUSOS, G. P. (1995). "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation." N Engl J Med **332**(20): 1351-62.
- CLAUSS, W. (2009). Glucocorticoide. Humanbiologie kompakt. W. Clauss. Heidelberg, Spektrum Verlag: 204.
- COHEN, S. und C. MILSTEIN (1967). "Structure and biological properties of immunoglobulins." Adv Immunol **7**: 1-89.
- COHEN, S. B. (2005). "B-cell depletion for rheumatic diseases: where are we?" MedGenMed **7**(2): 72.
- COLE, T. J., et al. (1995). "Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development." Steroids **60**(1): 93-6.
- COLLINS, S. J., et al. (1977). "Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture." Nature **270**(5635): 347-9.
- CRAXTON, A., et al. (2005). "BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway." J Exp Med **202**(10): 1363-74.
- DALAKAS, M. C. (1997). "Intravenous immune globulin therapy for neurologic diseases." Ann Intern Med **126**(9): 721-30.
- DALAKAS, M. C. (1998). "Mechanism of action of intravenous immunoglobulin and therapeutic considerations in the treatment of autoimmune neurologic diseases." Neurology **51**(6 Suppl 5): S2-8.
- DALAKAS, M. C. (1999). "Intravenous immunoglobulin in the treatment of autoimmune neuromuscular diseases: present status and practical therapeutic guidelines." Muscle Nerve **22**(11): 1479-97.
- DALAKAS, M. C. (2002). "Mechanisms of action of IVIg and therapeutic considerations in the treatment of acute and chronic demyelinating neuropathies." Neurology **59**(12 Suppl 6): S13-21.
- DALAKAS, M. C. (2004). "Intravenous immunoglobulin in autoimmune neuromuscular diseases." JAMA **291**(19): 2367-75.
- DALAKAS, M. C. (2006). "Role of IVIg in autoimmune, neuroinflammatory and neurodegenerative disorders of the central nervous system: present and future prospects." J Neurol **253** Suppl 5: V25-32.
- DALE, R. C., et al. (2000). "Treatment of severe complicated Kawasaki disease with oral prednisolone and aspirin." J Pediatr **137**(5): 723-6.
- DAMMACCO, F., et al. (1986). "Treatment of adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura with intravenous immunoglobulin: effects on circulating T cell subsets and PWM-induced antibody synthesis in vitro." Br J Haematol **62**(1): 125-35.
- DE BOSSCHER, K. und G. HAEGEMAN (2009). "Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids." Mol Endocrinol **23**(3): 281-91.
- DE BOSSCHER, K., et al. (1997). "Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13504-9.
- DE BOSSCHER, K., et al. (2003). "The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression." Endocr Rev **24**(4): 488-522.
- DE BOSSCHER, K., et al. (2006). "Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB." Oncogene **25**(51): 6868-86.
- DELFRAISSY, J. F., et al. (1985). "Suppressor cell function after intravenous gammaglobulin treatment in adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura." Br J Haematol **60**(2): 315-22.

- DHAWAN, L., et al. (2007). "A novel role for the glucocorticoid receptor in the regulation of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA stability." J Biol Chem **282**(14): 10146-52.
- DIEGEL, M. L., et al. (1994). "Cross-linking of Fc gamma receptor to surface immunoglobulin on B cells provides an inhibitory signal that closes the plasma membrane calcium channel." J Biol Chem **269**(15): 11409-16.
- DISTELHORST, C. W. (2002). "Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis." Cell Death Differ **9**(1): 6-19.
- DO, R. K. und S. CHEN-KIANG (2002). "Mechanism of BLyS action in B cell immunity." Cytokine Growth Factor Rev **13**(1): 19-25.
- DOI, M., et al. (2010). "Altered immunoglobulin A and M levels associated with changes in BAFF and APRIL after administration of intravenous immunoglobulin to treat Kawasaki disease." J Investig Allergol Clin Immunol **20**(5): 413-8.
- DU, J., et al. (2009). "Flow cytometry analysis of glucocorticoid receptor expression and binding in steroid-sensitive and steroid-resistant patients with systemic lupus erythematosus." Arthritis Res Ther **11**(4): R108.
- DWYER, J. M. (1992). "Manipulating the immune system with immune globulin." N Engl J Med **326**(2): 107-16.
- EDELMAN, G. M. (1991). "Antibody structure and molecular immunology." Scand J Immunol **34**(1): 1-22.
- EFTIMOV, F., et al. (2009). "Intravenous immunoglobulin for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy." Cochrane Database Syst Rev(1): CD001797.
- EHRCHEN, J., et al. (2007). "Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes." Blood **109**(3): 1265-74.
- FRANKLIN, E. C. (1975). "Structure and function of immunoglobulins." Acta Endocrinol Suppl (Copenh) **194**: 77-95.
- FU, L., et al. (2006). "Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas." Blood **107**(11): 4540-8.
- FUCHS, S., et al. (2008). "A disease-specific fraction isolated from IVIG is essential for the immunosuppressive effect of IVIG in experimental autoimmune myasthenia gravis." J Neuroimmunol **194**(1-2): 89-96.
- FUHLHUBER, V., et al. (2009). "Elevated B-cell activating factor BAFF, but not APRIL, correlates with CSF cerebellar autoantibodies in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome." J Neuroimmunol **210**(1-2): 87-91.
- GAGNE, D., et al. (1986). "Analysis of the relation between receptor binding affinity and antagonist efficacy of antiglucocorticoids." J Steroid Biochem **25**(3): 315-22.
- GAGNE, D., et al. (1985). "RU 38486: a potent antiglucocorticoid in vitro and in vivo." J Steroid Biochem **23**(3): 247-51.
- GALON, J., et al. (2002). "Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells." FASEB J **16**(1): 61-71.
- GARSIDE, H., et al. (2004). "Glucocorticoid ligands specify different interactions with NF-kappaB by allosteric effects on the glucocorticoid receptor DNA binding domain." J Biol Chem **279**(48): 50050-9.
- GAVIN, A. L., et al. (2003). "DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF." J Biol Chem **278**(40): 38220-8.
- GESSL, A., et al. (1993). "Tumour necrosis factor-alpha augments the expression of Fc IgE receptor (Fc epsilon RII/CD23) on human monocytic cell lines and down-regulates interleukin-4-driven Fc epsilon RII expression on monocytes." Immunology **78**(3): 476-81.

- GOLD, R., et al. (2007). "Drug Insight: the use of intravenous immunoglobulin in neurology--therapeutic considerations and practical issues." Nat Clin Pract Neurol **3**(1): 36-44.
- GOSSYE, V., et al. (2008). "Therapeutic implications of the nuclear factor-kappaB/nuclear receptor cross-talk." Front Biosci **13**: 4122-43.
- GREWAL, I. S. (2009). "Overview of TNF superfamily: a chest full of potential therapeutic targets." Adv Exp Med Biol **647**: 1-7.
- GROOM, J., et al. (2002). "Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome." J Clin Invest **109**(1): 59-68.
- GROOM, J. R., et al. (2007). "BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells." J Exp Med **204**(8): 1959-71.
- GROSE, R., et al. (2002). "A role for endogenous glucocorticoids in wound repair." EMBO Rep **3**(6): 575-82.
- GROSS, J. A., et al. (2001). "TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS." Immunity **15**(2): 289-302.
- GUIZANI, L., et al. (1996). "Mechanisms in interleukin-2 protection against glucocorticoid-induced apoptosis: regulation of AP-1 and glucocorticoid receptor transcriptional activities." J Interferon Cytokine Res **16**(8): 601-9.
- HAN, W., et al. (1995). "Cryo atomic force microscopy: a new approach for biological imaging at high resolution." Biochemistry **34**(26): 8215-20.
- HAVEL, P. J., et al. (1996). "Predominately glucocorticoid agonist actions of RU-486 in young specific-pathogen-free Zucker rats." Am J Physiol **271**(3 Pt 2): R710-7.
- HECK, S., et al. (1997). "I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor." EMBO J **16**(15): 4698-707.
- HECK, S., et al. (1994). "A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1." EMBO J **13**(17): 4087-95.
- HSU, B. L., et al. (2002). "Cutting edge: BLyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators." J Immunol **168**(12): 5993-6.
- HUARD, B., et al. (2004). "BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation." Int Immunol **16**(3): 467-75.
- HUARD, B., et al. (2001). "T cell costimulation by the TNF ligand BAFF." J Immunol **167**(11): 6225-31.
- HUGHES, R. A., et al. (2008). "Intravenous immune globulin (10% caprylate-chromatography purified) for the treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (ICE study): a randomised placebo-controlled trial." Lancet Neurol **7**(2): 136-44.
- HUGHES, R. A., et al. (2003). "Practice parameter: immunotherapy for Guillain-Barre syndrome: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology." Neurology **61**(6): 736-40.
- ICHIYAMA, T., et al. (2004). "Intravenous immunoglobulin inhibits NF-kappaB activation and affects Fc gamma receptor expression in monocytes/macrophages." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **369**(4): 428-33.
- IGAKI, T., et al. (2002). "Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway." EMBO J **21**(12): 3009-18.
- IMBACH, P., et al. (1981). "High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood." Lancet **1**(8232): 1228-31.
- ITTAH, M., et al. (2006). "B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjogren's syndrome." Arthritis Res Ther **8**(2): R51.

- JEFFERIS, R., et al. (1995). "Recognition sites on human IgG for Fc gamma receptors: the role of glycosylation." Immunol Lett **44**(2-3): 111-7.
- JOLLES, S., et al. (2005). "Clinical uses of intravenous immunoglobulin." Clin Exp Immunol **142**(1): 1-11.
- KAMEI, Y., et al. (1996). "A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors." Cell **85**(3): 403-14.
- KANEKO, Y., et al. (2006). "Pathology and protection in nephrotoxic nephritis is determined by selective engagement of specific Fc receptors." J Exp Med **203**(3): 789-97.
- KANG, J. S., et al. (2006). "B cell-activating factor is a novel diagnosis parameter for asthma." Int Arch Allergy Immunol **141**(2): 181-8.
- KASSEL, O. und A. C. CATO (2002). "Mast cells as targets for glucocorticoids in the treatment of allergic disorders." Ernst Schering Res Found Workshop(40): 153-76.
- KASSEL, O. und P. HERRLICH (2007). "Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects." Mol Cell Endocrinol **275**(1-2): 13-29.
- KATO, A., et al. (2006). "Airway epithelial cells produce B cell-activating factor of TNF family by an IFN-beta-dependent mechanism." J Immunol **177**(10): 7164-72.
- KAUPPI, B., et al. (2003). "The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism." J Biol Chem **278**(25): 22748-54.
- KAYAGAKI, N., et al. (2002). "BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2." Immunity **17**(4): 515-24.
- KAZATCHKINE, M. D. und S. V. KAVERI (2001). "Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin." N Engl J Med **345**(10): 747-55.
- KELKER, H. C., et al. (1985). "Characterization of human tumor necrosis factor produced by peripheral blood monocytes and its separation from lymphotoxin." Int J Cancer **36**(1): 69-73.
- KHARE, S. D., et al. (2000). "Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3370-5.
- KIM, S. J., et al. (2008). "Serum BAFF predicts prognosis better than APRIL in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP chemotherapy." Eur J Haematol **81**(3): 177-84.
- KLAESSON, S., et al. (1996). "Inhibition of immunoglobulin production in vitro by IgG and F(ab')<sub>2</sub> fragments, but not by the Fc portion." Scand J Immunol **43**(5): 574-82.
- KOFFMAN, B. M. und M. C. DALAKAS (1997). "Effect of high-dose intravenous immunoglobulin on serum chemistry, hematology, and lymphocyte subpopulations: assessments based on controlled treatment trials in patients with neurological diseases." Muscle Nerve **20**(9): 1102-7.
- KRAUSE, I., et al. (1998). "Anti-DNA and antiphospholipid antibodies in IVIG preparations: in vivo study in naive mice." J Clin Immunol **18**(1): 52-60.
- KRUMBHOLZ, M., et al. (2005). "BAFF is elevated in serum of patients with Wegener's granulomatosis." J Autoimmun **25**(4): 298-302.
- KRUMBHOLZ, M., et al. (2005). "BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma." J Exp Med **201**(2): 195-200.
- KRYSTUKOVA, O., et al. (2009). "Increased serum levels of B cell activating factor (BAFF) in subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies." Ann Rheum Dis **68**(6): 836-43.
- LAM, K. P., et al. (1997). "In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death." Cell **90**(6): 1073-83.

- LAM, L., et al. (1993). "Immunologically active proteins in intravenous immunoglobulin." Lancet **342**(8872): 678.
- LANZA, L., et al. (1996). "Prednisone increases apoptosis in in vitro activated human peripheral blood T lymphocytes." Clin Exp Immunol **103**(3): 482-90.
- LE POTTIER, L., et al. (2007). "BAFF, a new target for intravenous immunoglobulin in autoimmunity and cancer." J Clin Immunol **27**(3): 257-65.
- LEMM, G. (2002). "Composition and properties of IVIg preparations that affect tolerability and therapeutic efficacy." Neurology **59**(12 Suppl 6): S28-32.
- LESLEY, R., et al. (2004). "Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF." Immunity **20**(4): 441-53.
- LITINSKIY, M. B., et al. (2002). "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL." Nat Immunol **3**(9): 822-9.
- LUHDER, F. und H. M. REICHARDT (2009). "Traditional concepts and future avenues of glucocorticoid action in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis therapy." Crit Rev Immunol **29**(3): 255-73.
- LUKERT, B. P. und L. G. RAISZ (1990). "Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management." Ann Intern Med **112**(5): 352-64.
- MACKAY, F. und J. L. BROWNING (2002). "BAFF: a fundamental survival factor for B cells." Nat Rev Immunol **2**(7): 465-75.
- MACKAY, F. und H. LEUNG (2006). "The role of the BAFF/APRIL system on T cell function." Semin Immunol **18**(5): 284-9.
- MACKAY, F. und P. SCHNEIDER (2009). "Cracking the BAFF code." Nat Rev Immunol **9**(7): 491-502.
- MACKAY, F., et al. (2003). "BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival." Annu Rev Immunol **21**: 231-64.
- MACKAY, F., et al. (2005). "The BAFF/APRIL system: an important player in systemic rheumatic diseases." Curr Dir Autoimmun **8**: 243-65.
- MACKAY, F., et al. (1999). "Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations." J Exp Med **190**(11): 1697-710.
- MAHDI-ROGERS, M. und Y. A. RAJABALLY (2010). "Overview of the pathogenesis and treatment of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with intravenous immunoglobulins." Biologics **4**: 45-9.
- MAKATA, H., et al. (2006). "Anti-inflammatory effect of intravenous immunoglobulin in comparison with dexamethasone in vitro: implication for treatment of Kawasaki disease." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **373**(5): 325-32.
- MALHOTRA, R., et al. (1995). "Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein." Nat Med **1**(3): 237-43.
- MARSTERS, S. A., et al. (2000). "Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI." Curr Biol **10**(13): 785-8.
- MCKAY, L. I. und J. A. CIDLOWSKI (1998). "Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism." Mol Endocrinol **12**(1): 45-56.
- MCKERRACHER, L. und S. DAVID (2004). "Easing the brakes on spinal cord repair." Nat Med **10**(10): 1052-3.
- MIGITA, K., et al. (2007). "Elevated serum BAFF levels in patients with autoimmune hepatitis." Hum Immunol **68**(7): 586-91.
- MOISINI, I. und A. DAVIDSON (2009). "BAFF: a local and systemic target in autoimmune diseases." Clin Exp Immunol **158**(2): 155-63.
- MOORE, P. A., et al. (1999). "BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator." Science **285**(5425): 260-3.

- MUKHOPADHYAY, A., et al. (1999). "Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase." *J Biol Chem* **274**(23): 15978-81.
- MUZIKAR, K. A., et al. (2009). "Repression of DNA-binding dependent glucocorticoid receptor-mediated gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(39): 16598-603.
- NACHBAUR, D., et al. (1997). "A comparative study of the in vitro immunomodulatory activity of human intact immunoglobulin (7S IVIG), F(ab')<sub>2</sub> fragments (5S IVIG) and Fc fragments. Evidence for post-transcriptional IL-2 modulation." *Immunology* **90**(2): 212-8.
- NARDELLI, B., et al. (2001). "Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells." *Blood* **97**(1): 198-204.
- NEGI, V. S., et al. (2007). "Intravenous immunoglobulin: an update on the clinical use and mechanisms of action." *J Clin Immunol* **27**(3): 233-45.
- NEUBERGER, M. S. (1997). "Antigen receptor signaling gives lymphocytes a long life." *Cell* **90**(6): 971-3.
- NG, L. G., et al. (2004). "B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells." *J Immunol* **173**(2): 807-17.
- NILSON, B. H., et al. (1993). "Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain." *J Immunol Methods* **164**(1): 33-40.
- NIMMERJAHN, F., et al. (2007). "Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(20): 8433-7.
- NIMMERJAHN, F. und J. V. RAVETCH (2006). "Fcgamma receptors: old friends and new family members." *Immunity* **24**(1): 19-28.
- NORDEEN, S. K., et al. (1990). "Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element." *Mol Endocrinol* **4**(12): 1866-73.
- OHATA, J., et al. (2005). "Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines." *J Immunol* **174**(2): 864-70.
- PALIOGIANNI, F., et al. (1993). "Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT." *J Clin Invest* **91**(4): 1481-9.
- PAREKH, R. B., et al. (1985). "Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG." *Nature* **316**(6027): 452-7.
- PFAFFL, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- POLJAK, R. J. (1991). "Structure of antibodies and their complexes with antigens." *Mol Immunol* **28**(12): 1341-5.
- PORTER, R. R. (1991). "Lecture for the Nobel Prize for physiology or medicine 1972: Structural studies of immunoglobulins. 1972." *Scand J Immunol* **34**(4): 381-9.
- PRASAD, N. K., et al. (1998). "Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway." *J Immunol* **161**(7): 3781-90.
- PRATT, W. B. (1993). "The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor." *J Biol Chem* **268**(29): 21455-8.
- PRATT, W. B., et al. (2004). "Role of molecular chaperones in steroid receptor action." *Essays Biochem* **40**: 41-58.
- RAHMAN, Z. S., et al. (2003). "Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice." *J Exp Med* **198**(8): 1157-69.

- REICHARDT, H. M. und G. SCHUTZ (1998). "Glucocorticoid signalling--multiple variations of a common theme." *Mol Cell Endocrinol* **146**(1-2): 1-6.
- REYES, L. I., et al. (2008). "Dexamethasone inhibits BAFF expression in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis." *Cytokine* **42**(2): 170-8.
- RHEN, T. und J. A. CIDLOWSKI (2005). "Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs." *N Engl J Med* **353**(16): 1711-23.
- RHOADES, C. J., et al. (2000). "Monocyte-macrophage system as targets for immunomodulation by intravenous immunoglobulin." *Blood Rev* **14**(1): 14-30.
- ROLINK, A. G. und F. MELCHERS (2002). "BAFFled B cells survive and thrive: roles of BAFF in B-cell development." *Curr Opin Immunol* **14**(2): 266-75.
- ROLINK, A. G., et al. (1999). "The transition from immature to mature B cells." *Curr Top Microbiol Immunol* **246**: 39-43; discussion 44.
- ROLINK, A. G., et al. (2002). "BAFF is a survival and maturation factor for mouse B cells." *Eur J Immunol* **32**(7): 2004-10.
- ROSEN, F. S. und I. MACKAY (2001). "The immunology series comes to an end." *N Engl J Med* **345**(18): 1343-4.
- ROTTIER, B. L. und E. J. DUIVERMAN (2009). "Anti-inflammatory drug therapy in asthma." *Paediatr Respir Rev* **10**(4): 214-9.
- RUIZ DE SOUZA, V., et al. (1995). "Selective induction of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 in human monocytes by normal polyspecific IgG (intravenous immunoglobulin)." *Eur J Immunol* **25**(5): 1267-73.
- SAKAGUCHI, S., et al. (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." *Cell* **133**(5): 775-87.
- SAMUELSSON, A., et al. (2001). "Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor." *Science* **291**(5503): 484-6.
- SAPIR, T., et al. (2005). "Immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulins as a treatment for autoimmune diseases, cancer, and recurrent pregnancy loss." *Ann N Y Acad Sci* **1051**: 743-78.
- SCAPINI, P., et al. (2003). "G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional B<sub>LyS</sub>." *J Exp Med* **197**(3): 297-302.
- SCHACKE, H., et al. (2002). "Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids." *Pharmacol Ther* **96**(1): 23-43.
- SCHIAMANN, B., et al. (2001). "An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway." *Science* **293**(5537): 2111-4.
- SCHNEIDER, P. (2005). "The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation." *Curr Opin Immunol* **17**(3): 282-9.
- SCHNEIDER, P., et al. (1999). "BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth." *J Exp Med* **189**(11): 1747-56.
- SCHONEVELD, O. J., et al. (2004). "Mechanisms of glucocorticoid signalling." *Biochim Biophys Acta* **1680**(2): 114-28.
- SEGNITZ, B. und U. GEHRING (1990). "Mechanism of action of a steroidal antiglucocorticoid in lymphoid cells." *J Biol Chem* **265**(5): 2789-96.
- SENSEL, M. G., et al. (1997). "Amino acid differences in the N-terminus of C(H)2 influence the relative abilities of IgG2 and IgG3 to activate complement." *Mol Immunol* **34**(14): 1019-29.
- SHEPPARD, K. A., et al. (1998). "Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1." *J Biol Chem* **273**(45): 29291-4.
- SHU, H. B., et al. (1999). "TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens." *J Leukoc Biol* **65**(5): 680-3.

- SMITH, C. A., et al. (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." Cell **76**(6): 959-62.
- SMITH, M. R. (2003). "Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance." Oncogene **22**(47): 7359-68.
- STAHN, C. und F. BUTTGEREIT (2008). "Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids." Nat Clin Pract Rheumatol **4**(10): 525-33.
- STAHN, C., et al. (2007). "Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists." Mol Cell Endocrinol **275**(1-2): 71-8.
- STOHL, W. (2004). "Targeting B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus and other autoimmune rheumatic disorders." Expert Opin Ther Targets **8**(3): 177-89.
- STOHL, W. (2005). "BlySfulness does not equal blissfulness in systemic lupus erythematosus: a therapeutic role for BLyS antagonists." Curr Dir Autoimmun **8**: 289-304.
- SUNDSTROM, C. und K. NILSSON (1976). "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)." Int J Cancer **17**(5): 565-77.
- SUTHERLAND, A. P., et al. (2006). "Targeting BAFF: immunomodulation for autoimmune diseases and lymphomas." Pharmacol Ther **112**(3): 774-86.
- SZABO, S. J., et al. (2003). "Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses." Annu Rev Immunol **21**: 713-58.
- TACKENBERG, B., et al. (2009). "Impaired inhibitory Fcγ receptor IIB expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(12): 4788-92.
- TANGYE, S. G., et al. (2006). "BAFF, APRIL and human B cell disorders." Semin Immunol **18**(5): 305-17.
- TANKERSLEY, D. L. (1994). "Dimer formation in immunoglobulin preparations and speculations on the mechanism of action of intravenous immune globulin in autoimmune diseases." Immunol Rev **139**: 159-72.
- TENG, Y., et al. (2007). "Targeted therapies in rheumatoid arthritis: Focus on rituximab." Biologics **1**(4): 325-33.
- TERENGI, F., et al. (2004). "How long is IVIg effective in multifocal motor neuropathy?" Neurology **62**(4): 666-8.
- TERRY, L. J., et al. (2007). "Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport." Science **318**(5855): 1412-6.
- THA-IN, T., et al. (2008). "Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin." Trends Immunol **29**(12): 608-15.
- THA-IN, T., et al. (2007). "Intravenous immunoglobulins suppress T-cell priming by modulating the bidirectional interaction between dendritic cells and natural killer cells." Blood **110**(9): 3253-62.
- THIEN, M., et al. (2004). "Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches." Immunity **20**(6): 785-98.
- THOMAS, M. D., et al. (2006). "Regulation of peripheral B cell maturation." Cell Immunol **239**(2): 92-102.
- THOMPSON, J. S., et al. (2001). "BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF." Science **293**(5537): 2108-11.
- TRACY, J. A. und P. J. DYCK (2010). "Investigations and treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy and other inflammatory demyelinating polyneuropathies." Curr Opin Neurol **23**(3): 242-8.
- TSCHERNATSCH, M. und F. BLAES (2010). "Clinical and diagnostic findings in chronic immune-mediated neuropathies." Klin Neurophysiol **41**: 224-35.



- TSUBAKIO, T., et al. (1983). "Alteration of T cell subsets and immunoglobulin synthesis in vitro during high dose gamma-globulin therapy in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura." Clin Exp Immunol **53**(3): 697-702.
- TSUCHIYA, S., et al. (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." Int J Cancer **26**(2): 171-6.
- TUCKERMANN, J. P., et al. (2005). "Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis." Crit Rev Clin Lab Sci **42**(1): 71-104.
- UHER, F. und H. B. DICKLER (1986). "Cooperativity between B lymphocyte membrane molecules: independent ligand occupancy and cross-linking of antigen receptors and Fc gamma receptors down-regulates B lymphocyte function." J Immunol **137**(10): 3124-9.
- VALLEDOR, A. F. und M. RICOTE (2004). "Nuclear receptor signaling in macrophages." Biochem Pharmacol **67**(2): 201-12.
- VAN DEN BERG, L. H., et al. (1995). "Treatment of multifocal motor neuropathy with high dose intravenous immunoglobulins: a double blind, placebo controlled study." J Neurol Neurosurg Psychiatry **59**(3): 248-52.
- VAN SCHAIK, I. N., et al. (1992). "Polyvalent immunoglobulin for intravenous use interferes with cell proliferation in vitro." J Clin Immunol **12**(5): 325-34.
- VASSILEV, T., et al. (1999). "Normal human immunoglobulin suppresses experimental myasthenia gravis in SCID mice." Eur J Immunol **29**(8): 2436-42.
- WALLACH, D., et al. (1996). "Exploring cell death mechanisms by analyzing signaling cascades of the TNF/NGF receptor family." Behring Inst Mitt(97): 144-55.
- WU, Y., et al. (2000). "Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS." J Biol Chem **275**(45): 35478-85.
- XU, C., et al. (1998). "Modulation of endothelial cell function by normal polyspecific human intravenous immunoglobulins: a possible mechanism of action in vascular diseases." Am J Pathol **153**(4): 1257-66.
- XU, L. G. und H. B. SHU (2002). "TNFR-associated factor-3 is associated with BAFF-R and negatively regulates BAFF-R-mediated NF-kappa B activation and IL-10 production." J Immunol **169**(12): 6883-9.
- YAMAGUCHI, Y., et al. (1995). "Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G. Mapping of proteolytic cleavage sites in the hinge region." J Immunol Methods **181**(2): 259-67.
- YAN, M., et al. (2000). "Identification of a receptor for BLyS demonstrates a crucial role in humoral immunity." Nat Immunol **1**(1): 37-41.
- YU, G., et al. (2000). "APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity." Nat Immunol **1**(3): 252-6.
- ZHANG, G., et al. (2006). "Comparison of different brands of IVIg in an in vitro model of immune neuropathy." J Neuroimmunol **173**(1-2): 200-3.
- ZHANG, J., et al. (2001). "Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus." J Immunol **166**(1): 6-10.
- ZHANG, L., et al. (2009). "Identification of BLyS (B lymphocyte stimulator), a non-myelin-associated protein, as a functional ligand for Nogo-66 receptor." J Neurosci **29**(19): 6348-52.
- ZHU, X. J., et al. (2009). "High-dose dexamethasone inhibits BAFF expression in patients with immune thrombocytopenia." J Clin Immunol **29**(5): 603-10.
- ZHUANG, Q. und B. MAZER (2001). "Inhibition of IgE production in vitro by intact and fragmented intravenous immunoglobulin." J Allergy Clin Immunol **108**(2): 229-34.
- ZHUKOVSKY, E. A., et al. (2004). "TNF ligands: is TALL-1 a trimer or a virus-like cluster?" Nature **427**(6973): 413-4; discussion 414.

ZWEIMAN, B. (1989). "Theoretical mechanisms by which immunoglobulin therapy might benefit myasthenia gravis." Clin Immunol Immunopathol **53**(2 Pt 2): S83-91.

## X Publikationen

- (1) S. Altenkämper, **S. Bick**, I. Krasenbrink, M. Tschernatsch, A. Kirsten, F. Blaes, V. Fühlhuber; „Surface-binding autoantibodies and B-cell activating factor (BAFF) in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome“ *Buchbeitrag* **2008**, 335-342.
- (2) V. Fühlhuber, **S. Bick**, A. Kirsten, A. Hahn, T. Gerriets, M. Tschernatsch, M. Kaps, K. T. Preissner, F. Blaes, S. Altenkämper; „Elevated B-cell activating factor BAFF, but not APRIL, correlates with CSF cerebellar autoantibodies in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome“, *J. Neuroimmunol.* **2009**, 210(1-2): 87-91.
- (3) **S. Bick**, M. Tschernatsch, V. Fühlhuber, T. E. Trenczek, K. Faltermeier, H. Hackstein, M. Kaps, F. Blaes; „Down-regulation of the B-cell activating factor BAFF by intravenous immunoglobulins in CIDP – a new mechanism of action?“; *Paper in Vorbereitung*
- (4) **S. Bick**, M. Kaps, F. Blaes; „IVIg inhibits expression and release of the B-cell activating factor BAFF in the monocytic cell line U937“, *Poster*; Annual meeting of immunology of the Austrian and German societies; Vienna, Austria; Sept. 3<sup>rd</sup>-6<sup>th</sup> **2008**.
- (5) **S. Bick**, M. Kaps, F. Blaes; „Dexamethasone inhibits expression and release of the B-cell activating factor BAFF in monocytes“, *Poster*; 8<sup>th</sup> conference of the ICS and ISICR; Chicago, USA; Oct. 3<sup>rd</sup>-7<sup>th</sup> **2010**.

## XI Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<	Kleiner als
>	Größer als
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
6α-MP	6α-Methylprednisolon
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AChR	Acetylcholinrezeptor
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ad	Bis zu
AP-1	Aktivator-Protein 1
APRIL	Ein proliferationsinduzierender Ligand
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor der Tumornekrosefamilie
BAFF-R	BAFF-Rezeptor
BCMA	B-Zell-Maturationsantigen
BCR	B-Zellrezeptor
BD	Becton Dickinson
BLyS	B-Lymphozyt-Stimulator
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bud	Budesonid
C	Cytosin
CA	Coaktivator
CA	Kalifornien
CAML	Kalzium-modulierender Cyclophilin-Ligand
CD	<i>engl. = cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementär-DNA
CDR	<i>engl. = complementary determining region</i>
cds	Kodierende Sequenz
CIDP	Chronisch-entzündliche demyelinisierende Polyneuropathie
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRD	Zysteinreiche Domäne
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CSHL	<i>Cold Spring Harbor laboratory</i> (Institut)

Ct	<i>engl. = crossing point</i>
D	Deutschland
d	Schichtdicke
DC	Dendritische Zelle
DD	<i>engl. = death domain</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest	Destilliertes Wasser
Dex	Dexamethason
dGMean	Delta-GMean
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dsDNA	Doppelstrand-DNA
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enzymatische Chemielumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>engl. = enzyme linked immunadsorbed assay</i>
f	<i>engl. = forward</i>
Fab	Antigen bindendes Fragment
FACS	<i>engl. = fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	Kristallines Fragment
FCS	Fötale Kälberserum
FcγR	Fcγ-Rezeptor
FPLC	<i>engl. = fast protein liquid chromatography</i>
G	Guanin
Gam	<i>Gamunex®</i>
GAPDH	Glyzerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
GBS	Guillain-Barré Syndrom
GC	Glucocorticoid
GE	<i>engl. = general electrics</i>
GMean	Geometrisch-gemittelte Fluoreszenzintensität
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GRE	<i>engl. = GR response elements</i>
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HC	<i>engl. = heavy chain</i>
HCl	Salzsäure
HKG	<i>Housekeeping</i> -Gen
HPA	Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrinden-Achse
HRP	Merrettich-Peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITP	Idiopathische thrombozytopenische Purpura
IVIg	Intravenöses Immunglobulin
IκB	Inhibitor von NFκB
kDa	Kilodalton
KL	Konstante leichte Fraktion
KS	Konstante schwere Fraktion bzw. Konsensussequenz
LC	<i>engl. = light chain</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mA	Milliampere
MACS	<i>engl. = magnetic automated cell sorting</i>
MC	Mineralcorticoid
MD	Maryland
MG	Myasthenia Gravis
min	Minuten
mL	Milliliter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mRNA	<i>engl. = messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
NFκB	Nukleärer Faktor κB von aktivierten B-Zellen
nGRE	Negatives GRE
NIH	<i>engl. = national institutes of health</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NMWL	<i>engl. = nominal molecular weight limit</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
NY	New York
Ø	Durchmesser bzw. unstimulierte Zellen
Oct	<i>Octagam®</i>
OMS	Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMCs	Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
pg	Picogramm
pGRE	Positives GRE
pmol	Picomol
r	<i>engl. = reverse</i>
RA	Rheumatoide Arthritis

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>engl. = Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Echtzeit-PCR
s	Sekunde(n)
San	<i>Sandoglobulin®</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SS	Sjögrens Syndrom
ss	einzelsträngig
ssDNA	Einzelstrang-DNA
T	Thymin
Ta	Annealing-Temperatur
TACI	Transmembranaktivator und CAML-Interaktor
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TALL-1	TNF- und ApoL-verwandter auf Leukozyten exprimierter Ligand 1
TBS	TRISgepufferte Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
THANK	TNF-Homolog, der Apoptose, NFκB und cJUN-NH <sub>2</sub> -terminale Kinase aktiviert
THD	TNF-Homologie-Domäne
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TNFSF 13B	TNF-Superfamilie-Mitglied 13B
TRADD	TNF-assoziiertes <i>death domain</i> Protein
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>engl. = unit</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v %	Volumen-Volumen-Anteil
VL	Variable leichte Fraktion
VS	Variable schwere Fraktion
w/v %	Masse-Volumen-Anteil
WB	Western Blot
WI	Wiesbaden
x g	x faches der mittleren Erdschwerebeschleunigung
Z	Zellen

ZM	Zytoplasmamembran
ZNS	Zentrales Nervensystem



## XII Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: STRUKTURELLER AUFBAU DER BAFF-REZEPTOREN.....	8
ABB. 2: EXPRESSION DER BAFF-REZEPTOREN UND DIE BAFF-ABHÄNGIGKEIT VON B-ZELLEN IN DEN STADIEN DER B-ZELLENTWICKLUNG.....	9
ABB. 3: INTERAKTION VON BAFF MIT SEINEN REZEPTOREN UND IHRE FUNKTION IM IMMUNSYSTEM. ....	10
ABB. 4: DIE ROLLE VON BAFF IN DER PERIPHEREN TOLERANZ UND BEI DER ENTSTEHUNG VON AUTOIMMUNITÄT.....	13
ABB. 5: SCHEMATISCH DARSTELLUNG EINES IGG-ANTIKÖRPERS .....	16
ABB. 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER GENOMISCHEN REGULATION DURCH GCS.....	22
ABB. 7: BASALE EXPRESSION VON MEMBRANSTÄNDIGEM BAFF IN VERSCHIEDENEN MONOZYTÄREN ZELLINIEN. ....	67
ABB. 8: BASALE EXPRESSION VON INTRAZELLULÄREM BAFF IN VERSCHIEDENEN MONOZYTÄREN ZELLINIEN. ....	68
ABB. 9: BASALE FREISETZUNG VON LÖSLICHEM BAFF IN MONOZYTÄREN ZELLINIEN. ....	69
ABB. 10: HERUNTERREGULIERUNG DER BAFF-EXPRESSION IN MONOZYTEN. ....	71
ABB. 11: HERUNTERREGULIERUNG DER MEMBRANSTÄNDIGEN BAFF-EXPRESSION DURCH IVIG IN MONOZYTEN.....	72
ABB. 12: HERABSETZUNG DER INTRAZELLULÄREN BAFF-EXPRESSION IN U937-ZELLEN NACH STIMULATION MIT IVIG. ....	73
ABB. 13: WESTERN BLOT-ANALYSE DER ZYTOPLASMATISCHEN FRAKTION VON U937-ZELLEN. .....	74
ABB. 14: ÜBERPRÜFUNG DER REINHEIT DER PRIMÄR ISOLIERTEN MONOZYTEN.....	75
ABB. 15: VERGLEICH DER BASALEN UND DER LPS-STIMULIERTEN OBERFLÄCHENEXPRESSION VON BAFF AUF U937-ZELLEN UND PRIMÄREN MONOZYTEN. ....	76
ABB. 16: HERABSETZUNG DER MEMBRANSTÄNDIGEN BAFF-EXPRESSION IN PRIMÄREN MONOZYTEN DURCH IVIG.....	77
ABB. 17: ABNAHME DER INTRAZELLULÄREN BAFF-EXPRESSION IN PRIMÄRISOLIERTEN MONOZYTEN DURCH IVIG.....	78
ABB. 18: VERRINGERUNG DER BAFF-FREISETZUNG IN MONOZYTEN DURCH IVIG. ....	79
ABB. 19: VERRINGERUNG DER BAFF-FREISETZUNG IN PRIMÄREN MONOZYTEN DURCH IVIG. .	80
ABB. 20: BESTIMMUNG DER RELATIVEN BAFF-MRNA-MENGE.....	81
ABB. 21: AUFHEBUNG DER HERABSETZUNG DER EXPRESSION VON MEMBRANGEBUNDENEM BAFF IN U937-ZELLEN DURCH ENTFERNUNG VON IVIG. ....	83
ABB. 22: AUFHEBUNG DER HERABSETZUNG DER INTRAZELLULÄREN BAFF-EXPRESSION IN U937-ZELLEN NACH ENTFERNEN VON IVIG. ....	84

ABB. 23: ABNAHME DES MEMBRANSTÄNDIGEN BAFF UNABHÄNGIG VON IVIG-PRÄPARATION.	85
ABB. 24: VERDICHTUNG DER LINKEN ZELLPOPULATION DURCH <i>OCTAGAM</i> ® UND <i>SANDOGLOBULIN</i> ®.	86
ABB. 25: <i>OCTAGAM</i> ® STEIGERT DEN ANTEIL TOTER ZELLEN IN DER 72 H-KULTUR VON MONOZYTEN.	88
ABB. 26: VERRINGERUNG DER INTRAZELLULÄREN BAFF-EXPRESSION IN MONOZYTEN UNABHÄNGIG VON DER IVIG-PRÄPARATION.	89
ABB. 27: VERRINGERTE FREISETZUNG VON BAFF IN MONOZYTEN DURCH DIVERSE IVIG- PRÄPARATIONEN.	90
ABB. 28: ABNAHME DER EXPRESSION DES MEMBRANGEBUNDENEN BAFF IN MONOZYTEN DURCH HUMANES IGG.	92
ABB. 29: ABNAHME DER INTRAZELLULÄREN BAFF-EXPRESSION IN MONOZYTEN DURCH HUMANES IGG.	93
ABB. 30: HERUNTERREGULIERUNG DER BAFF-FREISETZUNG IN MONOZYTEN DURCH HUMANES IGG.	94
ABB. 31: CHROMATOGRAPHISCHE AUFTRENNUNG VON IVIG NACH PAPAIN-VERDAU.	96
ABB. 32: HERABSETZUNG VON MEMBRANSTÄNDIGEM BAFF DURCH F(AB') <sub>2</sub> IN MONOZYTEN.	97
ABB. 33: HERABSETZUNG DER INTRAZELLULÄREN BAFF-EXPRESSION DURCH F(AB') <sub>2</sub> IN MONOZYTEN.	98
ABB. 34: F(AB') <sub>2</sub> -FRAGMENT VERMITTELT VERRINGERUNG DER FREISETZUNG VON BAFF IN MONOZYTEN.	99
ABB. 35: MODULATION DER TRANSKRIPTIONSLEVEL VON FcγR-REZEPTOREN IN MONOZYTEN DURCH IVIG.	100
ABB. 36: ABNAHME DER MEMBRANGEBUNDENEN BAFF-EXPRESSION IN MONOZYTEN DURCH DEXAMETHASON.	103
ABB. 37: HERUNTERREGULIERUNG DER MEMBRANSTÄNDIGEN BAFF-EXPRESSION IN MONOZYTEN DURCH DEXAMETHASON.	104
ABB. 38: HERABSETZUNG DER EXPRESSION VON INTRAZELLULÄREM BAFF IN MONOZYTEN DURCH DEXAMETHASON.	105
ABB. 39: VERRINGERUNG DER MEMBRANSTÄNDIGEN BAFF-EXPRESSION IN MONOZYTEN DURCH DEXAMETHASON.	106
ABB. 40: VERRINGERUNG DER EXPRESSION VON MEMBRANSTÄNDIGEM BAFF IN PRIMÄREN MONOZYTEN DURCH DEXAMETHASON.	107
ABB. 41: HERUNTERREGULIERUNG DER INTRAZELLULÄREN BAFF-EXPRESSION DURCH DEXAMETHASON IN PRIMÄREN MONOZYTEN.	108
ABB. 42: HERUNTERREGULIERUNG DER FREISETZUNG VON BAFF DURCH DEXAMETHASON IN MONOZYTEN.	109
ABB. 43: VERRINGERUNG DER BAFF-FREISETZUNG IN PRIM. MONOZYTEN DURCH DEXAMETHASON.	110
ABB. 44: VERRINGERUNG DER BAFF-MRNA DURCH DEXAMETHASON IN MONOZYTEN.	111

---

ABB. 45: HERUNTERREGULIERUNG VON MEMBRANGEBUNDENEN BAFF DURCH BUDESONID VERGLEICHBAR MIT DEXAMETHASON IN MONOZYTEN.....	112
ABB. 46: HERUNTERREGULIERUNG DER MEMBRANSTÄNDIGEN BAFF-EXPRESSION DURCH DEXAMETHASON UND 6A-METHYLPREDNISOLON IN MONOZYTEN.....	113
ABB. 47: RUNTERREGULIERUNG DER INTRAZELLULÄREN BAFF-EXPRESSION IN MONOZYTEN DURCH BUDESONID VERGLEICHBAR MIT DEXAMETHASON. ....	114
ABB. 48: HERABSETZUNG DER INTRAZELLULÄREN BAFF-EXPRESSION DURCH 6A- METHYLPREDNISOLON VERGLEICHBAR MIT DEXAMETHASON IN MONOZYTEN.....	115
ABB. 49: HERUNTERREGULIERUNG DER BAFF FREISETZUNG IN MONOZYTEN DURCH BUDESONID VERGLEICHBAR MIT DEXAMETHASON. ....	116
ABB. 50: VERRINGERUNG DER BAFF-FREISETZUNG DURCH DEXAMETHASON UND 6A- METHYLPREDNISOLON IN MONOZYTEN. ....	117
ABB. 51: AUFHEBUNG DER HERUNTERREGULIERUNG DER MEMBRANGEBUNDENEN BAFF- EXPRESSION DURCH RU486.....	119
ABB. 52: AUFHEBUNG DER DEXAMETHASON-VERMITTELTEN HERUNTERREGULIERUNG DER INTRAZELLULÄREN BAFF-EXPRESSION DURCH RU486. ....	120
ABB. 53: AUFHEBUNG DER DEXAMETHASON-VERURSACHTEN HERUNTERREGULIERUNG DER BAFF-FREISETZUNG DURCH RU486.....	121
ABB. 54: POTENTIELLE <i>GLUCOCORTICOID RESPONSE ELEMENTS</i> (GRES) IN DER PROMOTER- SEQUENZ VON BAFF IDENTIFIZIERT. ....	123
ABB. 55: DEXAMETHASON HAT KEINE EINWANDERUNG VON GR-A IN DEN ZELLKERN ZUR FOLGE. ....	125

## **XIII Tabellenverzeichnis**

TAB. 1: VERWENDETE ZELLLINIEN .....	28
TAB. 2: VERWENDETE PRIMER.....	30
TAB. 3: ÜBERSICHT DER VERSCHIEDENEN IMMUNGLOBULINPRÄPARATE ZUR INTRAVENÖSEN INJEKTION .....	85
TAB. 4: ÜBERSICHT DER RESULTATE AUS SCHLÜSSELEXPERIMENTEN MIT IVIG .....	101
TAB. 5: ÜBERSICHT DER RESULTATE AUS SCHLÜSSELEXPERIMENTEN MIT DEX.....	126

## XIV Danksagung

Danke ...

möchte ich an dieser Stelle an alle sagen, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden, die mich unterstützt und die letztlich zur Realisierung dieser Arbeit beigetragen haben.

- Prof. Dr. rer. nat. Tina E. Trenczek für die Bereitschaft die Betreuung meiner Doktorarbeit außerhalb des Fachbereichs Biologie und Chemie zu übernehmen und das Interesse an meiner Arbeit sowie die konstruktiven Anmerkungen und Ratschläge.
- Prof. Dr. med. Franz Blaes für die Bereitstellung des Themas und des Labors als auch für seine Unterstützung, Ratschläge und konstruktive Kritik, die zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Ermöglichung einer 2jährigen Fortbildung parallel zu meiner Doktorarbeit.
- Dr. Marlene Tschernatsch-Gerriets für die Unterstützung, konstruktiven Diskussionen, tolle Gespräche und die Freundschaft.
- Prof. H. Hackstein, Prof. W. Kummer und Prof. K. T. Preissner für die gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit, das Methodenspektrum für diese Arbeit über die Räume des neurologischen Labors hinaus zu erweitern. Ein großes Dankeschön in diesem Zusammenhang auch an deren Mitarbeiter A. Nockher, M. Bodenbenner, U. Schubert, H. Thiele für Einführung in die jeweilige Methode und Hilfe bei Fragen und Problemen.
- Helga, Conni und Marita für die Mitwirkung bei den nephelometrischen Messungen (auch kurz vor Feierabend) und für die guten Ratschläge, die zum Wachsen und Gedeihen meines kleinen Gärtchens geführt haben.
- Edith für die tollen Gespräche, die fortwährende Unterstützung bei der Laborarbeit und darüber hinaus...
- Pratibha für die vielen aufbauenden Gespräche, die gute Zusammenarbeit, ihr sonniges Gemüt und das leckere indische Essen.
- Nina, Oli, Steffi und Diana für die nette Aufnahme in dieses Labor und die anfängliche Einführung in die geheimnisvolle Welt der Durchflusszytometrie und bei

dem Umgang mit dem alten FACSCalibur, bei dem Streicheln manchmal Wunder bewirkt haben ...

- Allen aus den Arbeitsgruppen AG Blaes/Tschernatsch-Gerriets und AG Berghoff, die zu einem guten Arbeitsklima beigetragen haben für ihre Hilfe, Unterstützung und Kollegialität während der gesamten Zeit.
- Allen Blutspendern, die sich für die Verwendung ihres „Lebenssaftes“ zu Forschungszwecken im Rahmen dieser Arbeit einverstanden erklärten.
- Rhönkliniken GmbH für das Stipendium.
- GGL (Giessener Graduierten Zentrum der Lebenswissenschaften) für das interessante Angebot an Kursen und Workshops und die Förderung des „Networkings“ sowie für ihr Engagement und ihre Unterstützung.
- Die Damen der Klinikapothek, die ich regelmäßig besuchen durfte, um unsere Antikörper abzuholen.
- Meinem Schatz Ingo für die Unterstützung und aufmunternden, förderlichen Gespräche während der gesamten Zeit. Du warst immer für mich da, egal ob es etwas zum Lachen, zum Weinen, zum Feiern oder zum Ärgern gab. DANKE!
- Meinen lieben Eltern und meiner lieben Oma für die fortwährende Unterstützung und das Vertrauen in mich und ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre!!!
- Meinen Freunden und Bekannten für deren Warmherzigkeit, Hilfsbereitschaft, Inspiration und Motivation.
- Allen, die ich noch vergessen habe zu erwähnen.

## **XV Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit

### **UNTERSUCHUNG DER MODULATION VON EXPRESSION UND FREISETZUNG DES B-ZELL- AKTIVIERENDEN FAKTORS BAFF IN MONOZYTEN**

selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, den 13. Januar 2011

Sandra M. Bick